



**Sara Alexandra
Brunheta Lisboa**

**DISSOLUÇÃO E PRECIPITAÇÃO DE XILANAS
DURANTE O COZIMENTO KRAFT DE *E. GLOBULUS***



**Sara Alexandra
Brunheta Lisboa**

**Dissolução e precipitação de xilanas durante o
cozimento kraft de *E. globulus***

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Engenharia Química, realizada sob a orientação científica do Doutor Carlos Pascoal Neto, Professor Catedrático e Doutor Dmitry Evtyugin, Professor Associado com Agregação, do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Apoio financeiro da FCT e do FSE no
âmbito do III Quadro Comunitário de
Apoio.

*À minha filha Mariana,
que me faz olhar sempre para a frente e para o futuro com optimismo.*

o júri

presidente

Doutor António Ferreira Pereira de Melo
Professor Catedrático da Universidade de Aveiro

Doutor Carlos Pascoal Neto
Professor Catedrático da Universidade de Aveiro (Orientador)

Doutora Ana Paula Coelho Duarte
Professora Associada com Agregação da Faculdade de Engenharia da
Universidade da Beira Interior

Doutor Dmitry Victorovitch Evtyugin
Professor Associado com Agregação da Universidade de Aveiro (Co-
orientador)

Doutora Maria da Graça Videira Sousa Carvalho
Professora Auxiliar da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de
Coimbra

Doutora Maria do Rosário Gonçalves Reis Marques Domingues
Professora Auxiliar da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Aos meus orientadores, Prof. Doutor Carlos Pascoal Neto e Prof. Doutor Dmitry Evtugin pela oportunidade que me deram em desenvolver este trabalho e pelo apoio dado durante a sua elaboração.

Ao Instituto de Investigação Raiz pela disponibilização dos laboratórios para realização dos cozimentos e pelo fornecimento das madeiras e reagentes.

À Prof. Doutora Maria do Rosário Domingues e à Mestre Virgínia Gonçalves pela ajuda prestada nas análises de ESI-MS e pelo incansável apoio e disponibilidade no tratamento dos espectros e na leitura de revisão da parte de espectrometria de massa deste trabalho.

Ao Doutor Herbert Sixta, Mrs. Andrea Borgards e Walter Milacher, da Lenzing Aktiengesellschaft, pela ajuda dispensada nas análises de *peeling* enzimático e pela imensa disponibilidade e simpatia com que me acolheram durante a minha estadia em Lenzing, Áustria.

Ao Doutor Pedro Fardim e ao Doutor Prof. Bjarne Holmbom da Abo Akademi University em Turku, Finlândia, pela ajuda concedida nas análises de ESCA e ToF-SIMS e pela simpatia com que fui recebida.

Aos meus colegas de laboratório que tanto apoio me deram, especialmente durante a gravidez da minha filha, e pelo ambiente de amizade e cooperativismo que ajudaram a criar, permitindo trabalhar sempre de uma forma serena e agradável.

Aos amigos aveirenses, que estão sempre perto de mim para me apoiar e dar força.

À minha irmã que me admira independentemente do que eu faça.

Aos meus pais que me apoiam incondicionalmente com incentivos e positivismo e que mesmo longe estão sempre perto e no meu coração.

Ao Cristiano pelo apoio e ajuda incansável.

À minha filha Mariana que me faz rir, mesmo quando me apetece fazer o contrário.

Ao resto da minha família que estando longe, fazem questão de estar perto.

Ao CICECO pelo financiamento inicial da bolsa de doutoramento.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia e ao Fundo Social Europeu no âmbito do III Quadro Comunitário de Apoio, pelo apoio financeiro através da concessão da bolsa SFRH/BD/18311/2004

palavras-chave

Eucalyptus globulus, cozimento kraft, xilanas, glucanas, precipitação.

resumo

O primeiro grande objectivo deste trabalho foi compreender o comportamento das xilanas ao longo do cozimento, acompanhando as suas alterações estruturais e estimando a sua afinidade com pasta celulósica. Assim, seguiu-se o perfil de remoção das xilanas ao longo do cozimento e quantificou-se o teor de xilanas retidas nas pastas kraft. Verificou-se que a quantidade de polissacarídeos dissolvidos aumentou consideravelmente na fase inicial do cozimento e que se manteve aproximadamente constante na fase principal. Do material dissolvido no licor, 30-40% são hidratos de carbono na forma de açúcares e seus produtos de degradação. Cerca de 50% da xilana removida da madeira pode ser recuperada do licor por precipitação. Verificou-se ainda que aproximadamente 60% das xilanas da madeira foram retidas na pasta até final do cozimento.

As xilanas das pastas kraft e dos licores foram caracterizadas exaustivamente ao longo do cozimento. As xilanas que permaneceram na pasta têm uma estrutura e uma composição diferentes daquelas que foram dissolvidas no licor de cozimento. Nomeadamente, as xilanas das pastas apresentaram uma diminuição ligeira do peso molecular médio e uma conversão significativa dos ácidos 4-*O*-metilglucurónicos (MeGlcA) em ácidos hexenurónicos (HexA) sem que tenha sido observado uma diminuição acentuada no teor total de ácidos urónicos. O grau de ramificação de xilanas da pasta com ácidos urónicos e outras hemiceluloses apresentou-se em média menor do que das xilanas da madeira. As xilanas do licor apresentaram um menor teor de ácidos urónicos (composto essencialmente por HexA) e uma maior grau de associação com glucanas e galactanas do que as xilanas da pasta. As xilanas do licor mostraram ter um peso molecular médio 30% inferior ao das xilanas das pastas, resultado de uma maior degradação ou da dissolução preferencial das xilanas de menor peso molecular.

A alcalinidade do licor de cozimento mostrou ter influência na composição das xilanas das pastas e do licor. Ambas as xilanas apresentaram um aumento no teor de xilose com o aumento da alcalinidade (e uma diminuição no teor de ramificações). Embora se tenha observado uma diminuição do teor as glucanas e as galactanas, estas apresentaram, ainda assim, alguma estabilidade com o aumento da alcalinidade.

Foi provado pela primeira vez a presença de quantidades significativas de glucanas (cerca de 4.5%) na madeira de *Eucalyptus globulus*, essencialmente na forma α -glucanas (amido). Verificou-se que as glucanas são a segunda hemicelulose mais abundante, com as α -glucanas a representarem cerca de 4%. Verificou-se que o amido da madeira é composto por 83% de amilopectina e 17% de amilose. Estimou-se ainda que a quantidade de glucomanana na madeira é de 2,5%. Utilizando técnicas avançadas de RMN (TOCSY e HSQC) e espectrometria de massa com ionização por electrospray (ESI-MS, ESI-MS/MS e ESI-MSⁿ) foi comprovada pela primeira vez a ligação existente entre α -glucanas e as xilanas via resíduos de MeGlcA. Este facto explica associação estrutural entre xilanas e glucanas e a possível precipitação conjunta destas hemiceluloses na superfície das fibras.

O segundo grande objectivo deste trabalho foi entender que parâmetros do cozimento kraft são preponderantes no aumento do teor de xilanas nas pastas. As superfícies das fibras, obtidas nos diferentes ensaios, foram analisadas por técnicas complementares: ESCA, ToF-SIMS, peeling enzimático, difracção de raio-X, microscopia óptica e SEM.

Nos cozimentos kraft convencionais, apenas com alteração das condições processuais (tempo de cozimento e alcalinidade do licor de cozimento), não se verificou grandes diferenças no teor de xilose na pasta, não se podendo concluir se a precipitação das xilanas na superfície ocorreu.

Nos ensaios modelos realizados por extensão do cozimento e abaixamento forçado do pH do licor negro, por adição de um ácido, verificou-se que o abaixamento do pH provocou uma precipitação ligeira de xilanas nas fibras das pastas (até 1,4% no teor de xilanas), concorrendo com a precipitação da lenhina do licor. No entanto, verificou-se que o pH final do licor não é o único parâmetro a condicionar a retenção de xilanas na pasta.

Os ensaios modelos realizados pela deposição de xilanas em fibras celulósicas (pastas brancas, algodão comercial e cotton linters) revelaram que o aumento da concentração de xilana na solução, o aumento do pH desta solução e o tempo de ensaio resultam em maiores quantidades de xilana retidas nas fibras de celulose. A fonte de celulose utilizada e as suas características químicas (teor de xilanas), supramoleculares (grau de cristalinidade de celulose) e morfológicas (degradação mecânica das fibras e área superficial específica resultante) apresentaram também influência na quantidade de xilana retida. O *peeling* enzimático mostrou que a retenção de xilanas nas fibras celulósicas resulta de vários mecanismos: precipitação e adsorção na superfície e difusão para o interior de parede celular das fibras. Além disso verificou-se que a remoção das xilanas é um processo reversível. Os mecanismos de retenção de xilanas revelados durante este trabalho permitiram compreender melhor o comportamento dos polissacarídeos dissolvidos no licor negro e relativamente às suas afinidades com a pasta kraft.

keywords

Eucalyptus globulus, kraft cooking, xylans, glucans, precipitation

abstract

The main goal of this work was to understand the xylans behaviour during kraft cooking, following its structural changes, and to determine xylans affinity to the cellulosic pulps. To reach these objectives, the quantity of removed and retained xylans in the kraft pulps during kraft cooking have been determined. The quantity of dissolved material increased considerably during the initial phase of the cooking and maintained approximately constant in the bulk phase. Among the dissolved material 30-40% are carbohydrates and their degradation products, and polymeric xylans (around 50% of xylans removed from the wood could be recovered). Approximately 60% of wood xylans were retained in the pulp until the end of the kraft cooking.

The xylans from kraft pulp and black liquor were characterized exhaustively. The xylans that remained in the pulp had different structure and chemical composition when compared to xylans dissolved in the cooking liquor. The xylans in pulp had a small variation in the average molecular weight, when compared to wood xylans, and showed a significant conversion of 4-*O*-methylglucuronic acid groups (MeGlcA) to hexenuronic acid residues (Hexa) without a considerable loss of uronic moieties. The xylans from pulp possessed a lower degree of the ramification with uronic moieties and other hemicelluloses than the xylans from the wood. The xylans from black liquor showed a lower content in uronic acids (composed essentially by HexA) and a higher association with glucans and galactans when compared to xylans from the pulp. The xylans from black liquor showed also an average molecular weight of 30% lower than the one obtained for xylans in pulp. This is a result of degradation reactions or the preferential dissolution of low molecular weight xylans in the black liquor.

The alkalinity of the cooking liquor showed some influence on the composition of pulp and liquor xylans. When the alkalinity of the cooking was raised, the xilose content in xylans from pulp and liquor increased. Although the contents of glucans and galactanas in the xylan composition diminished with the increase of alkalinity, they were still presented in xylans thus revealing relative stability towards alkalinity.

It was demonstrated for the first time the presence of significant amounts of glucans (about 4,5%) in the *E. globulus* wood, especially in the form of α -glucan (starch). It was showed that α -glucans are the second most abundant hemicellulose of the wood (about 4%) after xylans. It was determined that starch is composed by 83% of amylopectin and 17% of amylose. The amounts of glucomannans did not exceeded 2,5% based on the oven dried wood. The employment of advanced NMR (TOCSY and HSQC) and mass spectrometry (ESI-MS, ESI-MS/MS e ESI-MSⁿ) techniques allowed, for the first time, the confirmation for the chemical linkage between α -glucans and xylans via MeGlcA residues. This result explains the structural association between glucans and xylans and the simultaneous precipitation of these two hemicelluloses onto fibres surface.

The second task of this work was to define the relevant parameters for the xylan retention in pulps at the end of the kraft cooking. The fibres surfaces were analyzed by a set of complementary techniques: ESCA, ToF-SIMS, enzymatic peeling, X-ray diffraction, optic microscopy and SEM.

The conventional cooking experiments, altering the cooking conditions (essentially time and alkalinity), did not show significant differences in the xilose content in pulp. Hence, no direct conclusions could be taken in relation to the precipitation of xylans onto the pulp surface.

From the model cooking experiments, by extending the cooking time and diminishing the final pH of black liquor, it was found that the decrease of pH result in some xylan precipitation (up to 1,4%), competing with the precipitation of lignin from liquor. These results showed that the final pH of the pulping liquor is not the only parameter to be considerer in the retention of xylans in pulp.

The experiments carried out by the deposition of xylans onto cellulosic fibres (bleached pulps, commercial cotton and cotton linters) revealed that the increase of xylan concentration in the solution, of the medium pH and of treatment times resulted in a higher retention of xylan in cellulose fibres. The source of cellulose fibres and their chemical (xylan content), supramolecular (degree of crystallinity) and morphological features (degree of mechanical degradation and specific area) also affected the retention of xylan in the fibres. The enzymatic peeling results showed that the xylan retention in the fibres occurred via several mechanisms: precipitation and/or adsorption at the surface and by diffusion into the interior of the cell walls of the fibres. These results also showed that the removal of xylans from the fibres is a reversible process.

The results obtained in this work allowed a better understanding of the xylan and other hemicelluloses behaviour during the kraft cooking and their affinity to the cellulosic pulps.

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AA – Alkali activo

Ara – Arabinose

a.s. – Absolutamente seco

FTIR – Espectroscopia de Infra-vermelhos com transformada de Fourier

Gal – Galactose

Glc – Glucose

Glc_p – Glucopiranoose

GPC – Cromatografia de permeação em gel

HexA – Ácido hexenurónico

IK – Índice kappa

IS – Índice de sulfureto

Man – Manose

MeGlcA – Ácido metilglucurónico

M_w – Peso molecular médio ponderado

Rham – Ramnose

SEM – Microscopia electrónica de varrimento

Xyl – Xilose

Xyl_p – Xilopiranoose

Espectrometria de massa

Ac – Grupo acetilo

H₂O – Água

Hex – Unidade de hexose

Hex-Hex – Duas unidades de hexose ligadas

Hex terminal – Unidade de hexose terminal

Hex-Hex terminal – Unidade de hexose ligada a uma unidade de hexose terminal

HexA-Xyl_n – n unidades de xilose com uma unidade substituída por uma unidade de ácido hexenurónico

MeGlcA – Ácido metilglucurónico

MeGlcA terminal – Ácido metilglucurónico terminal

Xyl – Unidade de xilose

Xyl-Ac – Unidade de xilose substituída por um grupo acetilo

Xyl-Ac-MeGlcA - Unidade de xilose substituída por um grupo acetilo e por uma unidade de ácido metilglucurónico

Xyl-MeGlcA – Unidade de xilose substituída por uma unidade de ácido metilglucurónico

Xyl₂-MeGlcA – Duas unidades de xilose consecutivas com uma unidade substituída por uma unidade de ácido metilglucurónico

Precipitação de xilanas

AlgC – Algodão comercial

Branco – Ensaio onde não foram adicionadas xilanas

Pbranq – Pasta kraft de eucalipto branqueada

PbranqEx – Pasta kraft de eucalipto branqueada extraída

PbranqXil-I e PbranqXil-II – Pasta branqueada extraída enriquecida com xilanas (duas amostras)

Xil-I e Xil-II – Ensaios onde não foram adicionadas concentrações crescentes de xilanas

ÍNDICE GERAL

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 Estrutura e composição química da madeira.....	25
2.1.1 A Celulose.....	31
2.1.2 As hemiceluloses	32
2.1.2.1 As xilanas	33
2.1.2.2 As mananas.....	37
2.1.2.3 As glucanas.....	39
2.1.2.4 As galactanas	41
2.1.3 A lenhina.....	42
2.2 O Processo kraft	44
2.2.1 Cozimento kraft	45
2.2.1.1 Reacções da lenhina.....	46
2.2.1.2 Reacções dos polissacarídeos	50
2.2.1.2.1 Comportamento geral dos polissacarídeos	50
2.2.1.2.2 Reacções de peeling e stopping.....	51
2.2.1.2.3 Reacção de hidrólise alcalina	53
2.2.1.2.4 Formação de ácido hexenurónico (HexA).....	54
2.2.2 Dissolução/retenção das hemiceluloses no licor durante o cozimento	57
2.2.2.1 Precipitação das xilanas.....	59
2.2.3 O Licor Negro	62
2.2.4 Variáveis do processo kraft.....	63
2.3 Importância das hemiceluloses na produção da pasta e do papel	67
3. PARTE EXPERIMENTAL	69
3.1 Cozimentos kraft	71

3.1.1	Madeira utilizada nos cozimentos.....	71
3.1.2	Licor branco ou de cozimento.....	71
3.1.3	Procedimento experimental utilizado nos cozimentos kraft	72
3.2	Xilanas da madeira, da pasta e do licor negro.....	74
3.2.1	Extracção das xilanas da madeira e das pastas	74
3.2.2	Isolamento e precipitação das xilanas dissolvidas no licor negro.....	74
3.2.3	Determinação do teor de sólidos do licor negro	75
3.3	Glucanas da madeira, da pasta e do licor negro	75
3.3.1	Isolamento das glucanas das pastas e da madeira	75
3.3.2	Perfil de extracção das glucanas e outros polissacarídeos	77
3.4	Caracterização de pastas, xilanas e glucanas	77
3.4.1	Determinação do teor de cinzas	77
3.4.2	Análise da composição em monossacarídeos	78
3.4.3	Determinação do teor em ácidos urónicos	79
3.4.4	Determinação do peso molecular médio.....	80
3.4.5	Análise de ligações por metilação.....	80
3.4.6	Espectroscopia de ^1H RMN, ^1H - ^1H TOCSY e ^1H HSQC.....	81
3.4.7	FTIR.....	82
3.4.8	Hidrólise enzimática	82
3.4.9	Fraccionamento dos oligossacarídeos.....	83
3.4.10	Espectrometria de massa.....	83
3.4.11	Quantificação do teor e determinação das absorvidades da amilopectina e da amilose	84
3.5	Estudos de precipitação de xilanas.....	86

3.5.1	Precipitação em pastas kraft cruas por abaixamento do pH do licor negro.	86
3.5.2	Precipitação de xilanas em pasta kraft branqueada.....	87
3.5.3	Precipitação de xilanas em fibras celulósicas	88
3.5.4	Extracção das xilanas precipitadas nas pastas kraft	89
3.5.5	Determinação do Índice Kappa (IK).....	89
3.5.6	Determinação dos teores de lenhina e de ácido hexenurónico	89
3.5.7	Determinação do teor de grupos carboxilo	90
3.5.8	ESCA ou XPS	91
3.5.9	ToF-SIMS	91
3.5.10	Peeling enzimático e análise de monossacarídeos por HPLC.....	92
3.5.11	Análise de imagem (microscopia óptica e SEM).....	93
3.5.12	Difracção de raios-X	94
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	95
4.1	Comportamento das xilanas no cozimento kraft.....	97
4.1.1	Perfil do comportamento e de extracção das xilanas ao longo do cozimento.....	97
4.1.2	Caracterização das hemiceluloses ao longo do cozimento	102
4.1.2.1	Análise da composição em monossacarídeos	103
4.1.2.2	Determinação do peso molecular médio	105
4.1.2.3	Determinação do teor em ácidos urónicos.....	107
4.1.2.4	Análise de ligações por metilação	109
4.1.2.5	Espectroscopia de RMN	112
4.1.3	Comportamento das hemiceluloses com a alteração das condições alcalinas do cozimento kraft	117
4.1.3.1	Análise da composição em monossacarídeos	119
4.1.3.2	Determinação do peso molecular médio	121
4.1.4	Conclusões	123

4.2	Glucanas e glucomananas da madeira e da pasta.....	126
4.2.1	Perfil de extracção das glucanas e de outros polissacarídeos ao longo do cozimento.....	126
4.2.2	Quantificação do teor de amilose e amilopectina	129
4.2.3	Caracterização das glucanas da pasta e da madeira	131
4.2.3.1	Análise da composição em monossacarídeos.....	132
4.2.3.2	Determinação do peso molecular médio	135
4.2.3.3	Análise de ligações por metilação	136
4.2.3.4	FTIR	138
4.2.3.5	Espectroscopia de RMN	140
4.2.3.6	Hidrólise enzimática e análise por espectrometria de massa.....	142
4.2.4	Conclusões	156
4.3	Estudos de precipitação de xilanas.....	159
4.3.1	Precipitação durante o cozimento kraft – Variação das condições processuais	159
4.3.1.1	Resultados dos cozimentos realizados.....	159
4.3.1.2	Análise da composição em monossacarídeos nas pastas.....	162
4.3.1.3	Peeling enzimático.....	163
4.3.2	Precipitação em pastas kraft cruas por abaixamento do pH do licor negro	165
4.3.2.1	Caracterização das xilanas das pastas.....	168
4.3.2.1.1	Análise da composição em monossacarídeos.....	169
4.3.2.2	Caracterização das pastas	170
4.3.2.2.1	Análise da composição em monossacarídeos.....	170
4.3.2.2.2	Determinação dos teores de lenhina e de ácido hexenurónico	171
4.3.2.2.3	Determinação dos grupos carboxilos.....	173
4.3.2.2.4	ESCA ou XPS.....	174
4.3.2.2.5	ToF-SIMS.....	176
4.3.2.2.6	Peeling enzimático.....	179
4.3.2.2.7	Precipitação de xilanas em pasta kraft branqueada	180
4.3.3	Precipitação de xilanas em fibras celulósicas	182

4.3.3.1	Variação da concentração de xilana	182
4.3.3.2	Variação do tempo de contacto	184
4.3.3.3	Variação do pH da solução.....	185
4.3.3.4	Variação da fonte de celulose.....	187
4.3.3.4.1	Caracterização das fibras.....	188
4.3.3.4.2	Retenção das xilanas nas várias fontes de cellulose.....	191
4.3.3.5	Análise à superfície das fibras	193
4.3.3.6	Peeling enzimático.....	195
4.3.3.7	Variação da xilana	197
4.3.4	Conclusões	199
5.	CONCLUSÕES FINAIS	203
6.	BIBLIOGRAFIA.....	209

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Os constituintes principais das folhosas, das resinosas e do <i>E. globulus</i> em percentagem de madeira seca. Valores médios de árvores típicas usadas na pasta (15, 19, 21).....	30
Tabela 2 – Tipos e abundâncias das ligações mais importantes na lenhina das resinosas e das folhosas (61-63, 67-69).	43
Tabela 3 – Composição dos ácidos carboxílicos principais existentes no licor negro de uma folhosa (Bétula) (99, 143).....	63
Tabela 4 - Composição em monossacarídeos da madeira, % m/m, madeira a.s.	71
Tabela 5 – Comprimentos de onda máximos e o coeficiente de absorção respectivo, ϵ (em $\text{ml.mg}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).	85
Tabela 6 – Perfil da adição de ácido sulfúrico. A quantidade total de solução adicionada à reacção foi de 20 ml, sendo a diferença entre a quantidade de ácido e volume final perfeito com água.....	86
Tabela 7 – Perfil da adição das soluções de NaOH_{aq} e de xilanas.	87
Tabela 8 – Teor de sólidos e % de açúcares, m/m, madeira a. s. (AA = 17% e IS = 28%).	99
Tabela 9 – Monossacarídeos dissolvidos ao longo do cozimento, % m/m, madeira a.s. (AA = 17% e IS = 28%). Concentração de xilanas nos licores negros.	100
Tabela 10 – Composição em monossacarídeos das xilanas precipitadas dos licores negros, % m/m, madeira a.s. (AA = 17% e IS = 28%).	100
Tabela 11 – Quantidade de xilanas precipitadas do licor. Percentagem mássica dos polissacarídeos totais e da xilose total dissolvidos no licor negro.	101
Tabela 12 - Composição em monossacarídeos (% normalizada) das xilanas precipitadas dos licores negros ou extraídas das pastas e da madeira.	104

Tabela 13 – Pesos moleculares médios das xilanas isoladas das pastas kraft, dos licores negros e da madeira.	106
Tabela 14 - Percentagem de ácidos urónicos das xilanas extraídas da pasta e das dissolvidas no licor negro.	108
Tabela 15 – Análise por metilação das xilanas precipitadas do licor negro (amostras obtidas aos tempos 100 e 180 min). (D2) – resíduos deuterados.	110
Tabela 16 – Quantificação dos H-1 dos ácidos urónicos nas xilanas das pastas e dos licores negros (nº de unidades por 100 unidades de Xylp)	116
Tabela 17 – Rendimento em pasta dos cozimentos e respectivo IK (m/m de madeira a.s.).	118
Tabela 18 – Rendimento da extracção das xilanas das pastas e quantidade de xilana extraída das pastas, em base madeira a. s., nos vários cozimentos.	118
Tabela 19 - Percentagem de xilanas precipitadas do licor negro em base madeira a. s. nos vários cozimentos.	119
Tabela 20 - Composição das xilanas precipitadas do licor negro e das xilanas extraídas da pasta (% normalizada)	120
Tabela 21 - Pesos moleculares médios das xilanas extraídas da madeira e da pasta e precipitadas dos licores negros.	122
Tabela 22 – Composição dos polissacarídeos extraídos da pasta kraft (% valores normalizados).	132
Tabela 23 – Composição dos polissacarídeos extraídos da madeira (% valores normalizados).	133
Tabela 24 – Unidades estruturais mais relevantes identificadas a amostra <i>GMHD</i> _z	137
Tabela 25 – Perdas de neutros e respectivas massas encontradas nas várias vias de fragmentação analisadas nos espectros de massa (ESI-MS/MS).	146

Tabela 26 – Fragmentações detectadas para os oligossacarídeos do tipo Xyl-MeGlcA-Hex _n com n=1-4.....	147
Tabela 27 - Fragmentações detectadas para os oligossacarídeos do tipo Xyl ₂ -MeGlcA-Hex _n (n=1 e 2)	150
Tabela 28 - Fragmentações detectadas para o oligossacarídeos Xyl ₅ -MeGlcA.	151
Tabela 29 – Fragmentações detectadas para os oligossacarídeos do tipo Xyl _m Ac-MeGlcA-Hex _n com m= 1 e 2 e n=1 e 4	152
Tabela 30 – Fragmentação do ião com <i>m/z</i> 687 no espectrómetro de massa de trapa de iões (MS ²).	154
Tabela 31 – Rendimento total dos cozimentos realizados a vários tempos de patamar com AA = 12%, 14%, 15% e 17% e IS = 28%.	160
Tabela 32 – % de incozidos resultantes dos cozimentos realizados a vários tempos de patamar com AA = 12%, 14%, 15% e 17% e IS = 28%.	160
Tabela 33 – Índice kappa das pastas resultantes dos cozimentos realizados a vários tempos de patamar com AA = 12%, 14%, 15% e 17% e IS = 28%.....	161
Tabela 34 – Resultados da precipitação por abaixamento do pH. A pasta de partida (sem precipitação) é a que apresenta o pH no licor de 12,8.	166
Tabela 35- Rendimento das extracções das xilanas das pastas onde foi induzida a precipitação e na pasta de partida (a que corresponde ao licor inicial de pH 12,8).	168
Tabela 36 – Composição das xilanas extraídas das pastas onde foi induzida a precipitação (% dos açúcares principais, normalizada).	169
Tabela 37 – Composição em monossacarídeos das pastas onde foram precipitadas as xilanas aos diferentes valores de pH no licor.	170
Tabela 38 – Resultados de XPS da superfície das pastas não extraídas e extraídas.....	175
Tabela 39 – Resultados retirados do espectro obtido por TOF-SIMS.....	178

Tabela 40 – Concentração de xilana na solução adicionada à pasta.	180
Tabela 41 – pH das soluções finais, depois dos ensaios experimentais a pH =10.	185
Tabela 42 – Composição em monossacarídeos das várias fontes de celulose usadas nas reacções de precipitação, % normalizada.	188
Tabela 43 - Grau de cristalinidade das fibras celulósicas usadas.	190

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Macroestrutura da madeira (9).	25
Figura 2 - A - Elementos constituintes da madeira de uma folhosa: A, B, C – elementos de vaso largos; D, E, F – elementos de vaso estreitos; G – traqueídeos; H – fibrotraqueóide; I – fibra libriforme; J – células de parênquima radial; K – células de parênquima axial. B - Elementos constituintes da madeira de uma resinosa: Traqueídeos de lenho inicial e tardio. A – pontuações areoladas entre traqueídeos; B – pontuações areoladas entre traqueído axial e radial; C – pontuações pinóides entre traqueído e raio parenquimático (9, 10).	26
Figura 3 - Esquema simplificado da ultraestrutura da parede celular de uma fibra adulta. ML – Lamela média, P – Parede primária, S1 – Camada externa da parede secundária, S2 – Camada intermédia da parede secundária, S3 – Camada interna da parede secundária e W – camada rugosa (14).	27
Figura 4 – Estrutura de uma fibra de celulose (13).	28
Figura 5 – Esquema geral da composição química da madeira.....	29
Figura 6 – Distribuição dos componentes principais ao longo da parede celular da fibra de uma resinosa (18).	29
Figura 7 – Modelo estrutural da Celulose. A – terminal não redutor, B – unidade de celobiose, C – terminal redutor.....	31
Figura 8 – Fórmulas dos monossacarídeos constituintes das hemiceluloses (31).....	33
Figura 9 – Estrutura das cadeias de homoxilanas. A – ligações $\beta(1\rightarrow3)$, B- ligações $\beta(1\rightarrow4)$, C- mistura de ligações $\beta(1\rightarrow3, 1\rightarrow4)$ (30).	34
Figura 10 – Estrutura primária da 4-O-metil-glucuronoxilana (30).	34
Figura 11 – Modelo estrutural da hemicelulose principal do <i>Eucalyptus globulus</i> (8).....	35
Figura 12 – Estrutura terminal das xilanas.	35

Figura 13 – Estrutura da (L-arabino)-4-O-metil-glucuronoxilana (30).....	36
Figura 14 – Estrutura primária da D-galacto-D-manana (30).	37
Figura 15 – Estrutura da D-gluco-D-manana (A) e (D-galacto)-D-gluco-D-manana (B) (30).	38
Figura 16 – Estrutura de uma β -D-glucana com uma mistura de ligações $\beta(1\rightarrow3)$ e $\beta(1\rightarrow4)$ (30).	39
Figura 17 – Estrutura da amilose (A) e da amilopectina (B).....	40
Figura 18 – Precursores da lenhina. H - álcool p-cumarílico, G - álcool coniferílico, S - álcool sinapílico.....	42
Figura 19 – Clivagem da ligação α -aril éter da unidade fenólica. Possível ligação β -arilo que impossibilita a separação das duas unidades (linha a tracejado) (68, 74).....	46
Figura 20 – Reacção do ião HS^- com a lenhina (68, 72, 74).	47
Figura 21 – Clivagem da ligação β -aril éter de unidades não fenólicas (68, 72, 74, 80). ...	47
Figura 22 – Clivagem da ligação carbono-carbono.....	48
Figura 23 – Reacções de condensação da lenhina em meio alcalino. A – Condensação primária, B- Condensação secundária, C- condensação com formaldeído (74).....	49
Figura 24 – Reacção de peeling.....	51
Figura 25 – Reacção de Stopping (74).	52
Figura 26 – Hidrólise das ligações glicosídicas em meio alcalino (74).	54
Figura 27 – Reacção de formação do ácido hexenurónico (108).	55
Figura 28 – Comportamento do HexA e do MeGlcA durante o cozimento kraft. O perfil de temperaturas é indicado (105, 109).	56
Figura 29 – Percentagem de xilose dissolvida (como monossacarídeo anidro) durante o cozimento kraft de três espécies de folhosas, sob condições de cozimento idênticas (7)...	59

Figura 30 – Perfil da temperatura do cozimento.	73
Figura 31 - Identificação das áreas de I_{c1} , I_{c2} e I_{amorfo} no difractograma da celulose.	94
Figura 32 – Indicação das amostras recolhidas e das fases do cozimento correspondentes.	98
Figura 33 - Balanço total aos polissacarídeos e às xilanas dissolvidas no licor e aos polissacarídeos totais e às xilanas precipitados do licor negro.....	102
Figura 34 - Curva de eluição de GPC das xilanas extraídas da madeira, da pasta e precipitadas do licor negro para o tempo de cozimento de 200 min.	105
Figura 35 – Cromatograma dos resíduos metilados da xilana precipitada do licor negro (tempo de cozimento de 100)	109
Figura 36 - Espectro de ^1H RMN das xilanas extraída da madeira, das pasta e das xilanas precipitadas do licor ao fim de 100, 155 min e 170 min de cozimento da madeira de <i>E.</i> <i>globulus</i>	113
Figura 37 - Região anomérica do espectro de TOCSY (D_2O , 25°C) da xilana do licor negro ao fim de 155 min de cozimento kraft da madeira de <i>E. globulus</i>	114
Figura 38 - Espectro de HSQC (D_2O , 25°C) das xilanas do licor negro ao fim de 155 min de cozimento kraft da madeira de <i>E. globulus</i> . As designações utilizadas são: X, unidade de Xylp interna na cadeia principal da heteroxilana; XUA, unidade de Xilp interna ligada em O-2 com uma unidade de ácido urónico (MeGlcA, MeGlcA-Hex ou HexA); G, unidade de $\beta\text{-(1}\rightarrow\text{4)-D-Glcp}$ interna na cadeia principal de D-glucana; αGr e βGr , α - e β -isómeros, respectivamente, no terminal redutor da unidade D-Glcp; Gt, terminal não-redutor da unidade $\alpha\text{-D-Glcp}$	115
Figura 39 – Percentagem de massa extraída com a solução alcalina de NaOH, 0,5M e a 90°C e 120°C	127
Figura 40 – Perfil de extracção dos polissacarídeos da madeira de <i>E. globulus</i> com NaOH 0.5 M a 90°C (A) e 120°C (B).	128

Figura 41 – Absorção obtida para várias quantidades de solução de iodo (2 mg I ₂ + 20 mg de KI/ml)	130
Figura 42 - Curva de eluição de GPC da glucana <i>GMHDz</i>	135
Figura 43 – Cromatograma obtido no GC-MS para a amostra <i>GMHDz</i>	136
Figura 44 – Espectro de ATR da amostra <i>GMHDz</i> e do amido comercial.	139
Figura 45 – Espectro de RMN ¹ H da glucana extraída da pasta (<i>GPHPp</i>).	140
Figura 46 - Região anomérica do espectro de ¹ H- ¹ H TOCSY (D ₂ O, 30°C) da glucana extraída do <i>E. globulus</i> (<i>GMHDz</i>).	141
Figura 47 – Cromatograma obtido no LEX/SEC para a glucana da madeira, depois da hidrólise enzimática.	144
Figura 48 - Espectro de massa (ESI-MS) da fracção ácida da glucana da madeira com a identificação das espécies mais abundantes	145
Figura 49 –Espectro de ESI-MS/MS do ião [M+Na] ⁺ de <i>m/z</i> : 525. Identificação da via de fragmentação mais abundante.	146
Figura 50 – Espectro de ESI-MS/MS do ião [M+Na] ⁺ de <i>m/z</i> : 687. Identificação das vias de fragmentação mais abundante. * 2 ^a via de fragmentação.	148
Figura 51 – Espectro de ESI-MS/MS do ião [M+Na] ⁺ de <i>m/z</i> : 1011. Identificação da via de fragmentação mais abundante.	149
Figura 52 – Espectro de ESI-MS/MS do ião [M+Na] ⁺ de <i>m/z</i> : 981. Identificação da via de fragmentação mais abundante.	150
Figura 53 – Espectro de ESI-MS/MS do ião [M+Na] ⁺ de <i>m/z</i> : 567. Identificação das vias de fragmentação mais abundante. * 2 ^a via de fragmentação.	151
Figura 54 – Espectro de ESI-MS/MS do ião [M+Na] ⁺ de <i>m/z</i> : 861. Identificação da via de fragmentação mais abundante.	153
Figura 55 – Espectro de MS ² e MS ³ do ião com <i>m/z</i> 687 e <i>m/z</i> 365, respectivamente.	154

Figura 56 - Espectro de MS ² dos padrões com <i>m/z</i> 365: A) Maltose; B) Isomaltose; C) Galactobiose β-(1→4); D) Galactobiose β-(1→6)	155
Figura 57 - Composição nos monossacarídeos principais das pastas resultantes dos cozimentos realizados a várias alcalinidades (% m/m, base madeira a.s.).....	162
Figura 58 – Perfil da quantidade de xilanas retiradas por <i>peeling</i> enzimático das fibras das pastas kraft convencionais resultantes do cozimento com AA = 14% e IS = 28%.	164
Figura 59 – Perfil da precipitação de xilanas com a diminuição do pH do meio reaccional.	166
Figura 60 – Perfil da precipitação da lenhina com a diminuição do pH do meio reaccional.	167
Figura 61 – Quantidade de HexA nas pastas onde foi induzida a precipitação de xilanas.	172
Figura 62 – Percentagem de lenhina nas pastas onde foi induzida a precipitação de xilanas. Variação da percentagem de lenhina com a diminuição do pH no licor.	172
Figura 63 – Concentração de grupos carboxilos nas pastas produzidas.....	174
Figura 64 – Imagens de ToF-SIMS da superfície das pastas. Imagens em modo positivo dos iões totais (TI), lenhina (137, 151, 167, 181 Da), xilana (113, 115, 133 Da) e celulose (127, 145 Da).....	177
Figura 65 – Perfil da quantidade de xilanas retiradas por <i>peeling</i> enzimático.	179
Figura 66 – Perfil da quantidade de xilanas retiradas por <i>peeling</i> enzimático.....	181
Figura 67 – Variação da percentagem de xilose nas amostras depois dos ensaios de retenção com a concentração de xilana na solução, para vários tempos de reacção.	183
Figura 68 - Variação da percentagem de xilose nas amostras depois dos ensaios de retenção com o tempo de reacção, para as várias concentrações.	184
Figura 69 - Variação da percentagem de xilose nas amostras depois da reacção de precipitação com o tempo de reacção com diferentes valores de pH.....	186

Figura 70 – Imagem microscópica das fibras de Cotton linters.	189
Figura 71 – Imagem microscópica das fibras de AlgC.	189
Figura 72 – Imagem microscópica das fibras de PbranqEx.	189
Figura 73 - Difractogramas de raios-X das diferentes amostras.	191
Figura 74 - Variação da fonte de celulose para dois tempos de reacção, pH =12 e concentração da solução de 16,7g/L.....	192
Figura 75 – Imagens de SEM das fibras de Cotton linters. A – Cotton linters de partida, B – Cotton linters resultante do ensaio alcalino sem xilanas a pH=10 e 150 min, C – Cotton linters depois do ensaio de retenção de xilanas com concentração de 16,7g /L, 150 min de reacção e pH= 10.	194
Figura 76 – Imagens de SEM das fibras de Cotton linters. A – Cotton linters resultante do ensaio alcalino sem xilanas a pH=12 e 150 min B – Cotton linters depois do ensaio de retenção de xilanas com concentração de 16,7g /L, 150 min de reacção e pH= 12.....	194
Figura 77 – Resultados do <i>peeling</i> enzimático. Ensaio de enriquecimento a pH=12, tempo de 150 min e concentração de 16,7g/L.	196
Figura 78 – Variação da diferença do teor de xilose na pasta por tempo de <i>peeling</i> decorrido (t-t ₀).	197
Figura 79 – Comportamento da xilana do licor negro em comparação com a xilana comercial.	198

1. INTRODUÇÃO

A indústria de pasta para papel é uma indústria de peso e com grande importância na economia portuguesa. 99% da madeira adquirida como matéria-prima para esta indústria provém de florestas nacionais e a produção de pasta em Portugal tem vindo a aumentar desde 1997 (15%) assim como a produção de papel (aproximadamente 55%) (1).

Além disso, este sector apresenta um nível de exportações superior ao das importações, tornando-se num sector bastante favorável à economia portuguesa, sendo o 4º sector líquido na economia nacional, a seguir à indústria dos têxteis, do couro e das madeiras (1, 2).

Ao nível das exportações, a pasta semi-branqueada de eucalipto é o principal produto exportado (aproximadamente 80% do valor da exportação de pasta), sendo a pasta branqueada de resinosas o principal produto importado (com cerca de 80% do valor das importações) (3).

Existe em todo o mundo vários processos de fabricação de pasta para papel, desde processos mecânicos a processos químicos. O processo kraft é um dos processos químicos existentes e além de ser o processo industrial mais usado em Portugal para produzir a pasta branqueada para papel, é também um dos mais conhecidos e utilizados a nível mundial. Este processo é bastante competitivo, pois além de ser um processo bastante flexível, no sentido de ser aplicável a uma grande variedade de madeiras, permite usar condições de cozimento menos drásticas

Em Portugal, assim como em toda a Península Ibérica, o *Eucalyptus globulus* é a árvore mais usada na produção de pasta kraft branqueada. Esta árvore apresenta características bastante interessantes que permitem obter rendimentos relativamente elevados e pastas com bastante qualidade, quando comparados com outras árvores do mesmo tipo. O *E. globulus* Labill é uma das espécies dominantes de Portugal e é originária da Austrália, que no final do século XIX foi introduzida na Península Ibérica onde foi adoptada como a maior fonte de madeira para a produção de pasta para papel (4, 5). O *E. globulus* é industrialmente uma matéria-prima muito favorável, devido ao seu rápido crescimento e da sua elevada quantidade de glucose e menor quantidade de lenhina na sua composição (5-7).

O principal objectivo de todos os processos de fabricação de pasta é a separação das fibras celulósicas, removendo a lenhina, e obtenção da celulose que constitui o principal componente da madeira. No entanto o cozimento kraft, embora manifeste rendimentos em

pasta relativamente bons, em comparação com os outros processos existentes nesta área, apresenta um rendimento na ordem dos 50%. Efectivamente o processo kraft poderia apresentar rendimentos na ordem dos 75-80% se fosse possível remover apenas a lenhina e preservar integralmente os polissacarídeos. Na realidade durante o cozimento kraft perde-se uma grande quantidade de outros polissacarídeos para além da lenhina, nomeadamente xilanas, no caso particular da madeira de folhosas.

A xilana, embora não seja o componente da madeira mais importante, é sem dúvida especial e importante para pasta. As xilanas têm alguma importância quando se fala em rendimento final do cozimento e nas propriedades papeleras das pastas, pois embora representem um pouco menos de 20% da pasta, são fundamentais na produção da folha de papel e na retenção dos aditivos.

Pensa-se que no final do cozimento as pastas ficam com maior teor em xilanas como resultado da precipitação e do abaixamento do pH do licor negro. Esta precipitação de xilanas, especialmente no fim do cozimento, quando o pH do licor de cozimento diminui, é um assunto pouco compreendido, razão pela qual se iniciou este trabalho. Este aumento do teor de xilanas é extremamente importante uma vez que a deposição de hemiceluloses na pasta, durante o cozimento kraft, pode aumentar o rendimento em pasta para papel, bem como melhorar as propriedades mecânicas da pasta final. Diversos estudos a nível mundial abordaram este efeito, tentando promover e compreender a precipitação das xilanas tanto nas folhosas como nas resinosas. Em relação ao *E. globulus* os trabalhos nesta área são bastantes escassos.

Diversos estudos mostraram que a hemicelulose predominante do *E. globulus*, uma 4-O-metilglucuronoxilana, tem uma estrutura bastante específica (8) que resiste razoavelmente bem às condições de cozimento usadas no processo kraft, pois é possível encontrá-la em quantidades elevadas na pasta no final do cozimento kraft (7). A compreensão e o seguimento das alterações estruturais das hemiceluloses retidas na pasta e dissolvidas no licor negro no final do cozimento são assuntos pouco estudados.

Uma vez que o *E. globulus* é a principal matéria-prima no fabrico de pasta branqueada na Península Ibérica e a sua xilana apresentar características muito peculiares, é importante caracterizar e compreender o comportamento das xilanas ao longo do cozimento para se poder estudar e compreender o processo de precipitação destas nas fibras. Na optimização do processo kraft será necessário entender que parâmetros são

preponderantes no aumento do teor de xilanas no fim do cozimento, sendo necessário estudar quais os que permitem aumentar a precipitação das xilanas na superfície da fibra.

Depois de se conhecer melhor o comportamento das xilanas ao longo do cozimento e que parâmetros têm maior influência na precipitação das xilanas na superfície da pasta, pode-se pensar em planejar melhoramentos ao processo químico kraft de forma a otimizá-lo para a madeira do *E. globulus* e aumentar o rendimento do processo.

Este trabalho tem então como objectivos principais:

1. Compreender o comportamento das xilanas durante o cozimento kraft em relação à sua remoção/retenção nas pastas celulósicas e ao seu grau de degradação no licor de cozimento;
2. Conhecer a estrutura e peso molecular das xilanas dissolvidas no licor de cozimento kraft de *Eucalyptus globulus*, caracterizando e entendendo as mudanças estruturais que ocorrem ao longo do cozimento;
3. Perceber a influência dos parâmetros de cozimento (alcalinidade e tempo) nas xilanas do licor e da pasta na remoção/retenção destas;
4. Compreender melhor o comportamento das outras hemiceluloses de *E. globulus* (além da xilana) durante o cozimento kraft e a sua contribuição para rendimento final da pasta;
5. Identificar os principais parâmetros que influenciam a precipitação das xilanas no cozimento kraft.

Para atingir estes objectivos foram efectuados vários cozimentos kraft a nível laboratorial com vários tempos e cargas alcalinas. Foi determinado o perfil de extracção das xilanas da madeira para o licor durante o cozimento. Caracterizaram-se as xilanas das pastas e dos licores correspondentes às várias fases do cozimento, tendo sido seguidas as alterações estruturais ocorridas. Depois da identificação das glucanas como segunda hemicelulose em abundância na madeira de eucalipto, estas foram isoladas e caracterizadas exaustivamente. Foi estudado ainda a extracção das glucanas da madeira e a sua retenção na pasta durante o cozimento.

A importância do pH final do licor de cozimento, na precipitação das xilanas na pasta, também foi estudada. Foram realizadas, para tal, experiências modelo com licor e pasta kraft nas condições próximas da lavagem de pasta. Foram igualmente estudados os efeitos do pH, da concentração de xilanas na solução e do tempo na precipitação destas.

Efectuaram-se vários ensaios modelo utilizando fibras celulósicas branqueadas, fibras derivadas de algodão e xilana comercial da bétula. As fibras produzidas foram analisadas e caracterizadas sumariamente de forma a relacionar os vários parâmetros estudados na precipitação das xilanas. A difusão de xilana no interior das fibras foi também analisada utilizando a técnica de peeling enzimático.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA MADEIRA

Existe uma diversidade de plantas e árvores na natureza, em que o componente principal é a celulose (matéria-prima principal para a produção de pasta para papel). A madeira, dependendo do tipo de árvore, tem características e composições diferentes e estas vão influenciar a qualidade e as especificações das pastas obtidas no fim do cozimento. Desta forma é necessário conhecer bem a matéria-prima do processo de fabricação de pasta.

As árvores podem ser divididas em gimnospermas, também conhecidas por resinosas, e angiospermas, também conhecidas como folhosas.

Do ponto de vista industrial, apenas a parte interior do tronco, o xilema, serve de matéria-prima para o fabrico de pasta. A casca, a parte exterior do tronco, não tem utilidade na produção de pasta para papel (Figura 1).

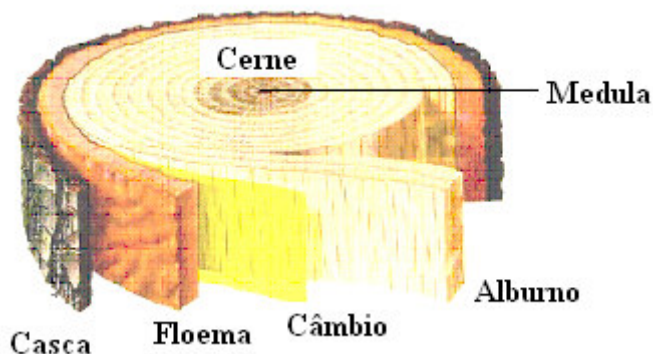


Figura 1 – Macroestrutura da madeira (9).

A madeira é um material compósito constituído por células alongadas, a maior parte delas orientadas longitudinalmente. Estas células podem variar de formato, dependendo da sua função. Providenciam a força mecânica à árvore além de terem a função de transporte de líquidos e nutrientes e ainda de armazenamento das reservas de alimentos. É possível encontrar três tipos de células na constituição da madeira: as células de condução, as células de suporte e as células de armazenagem.

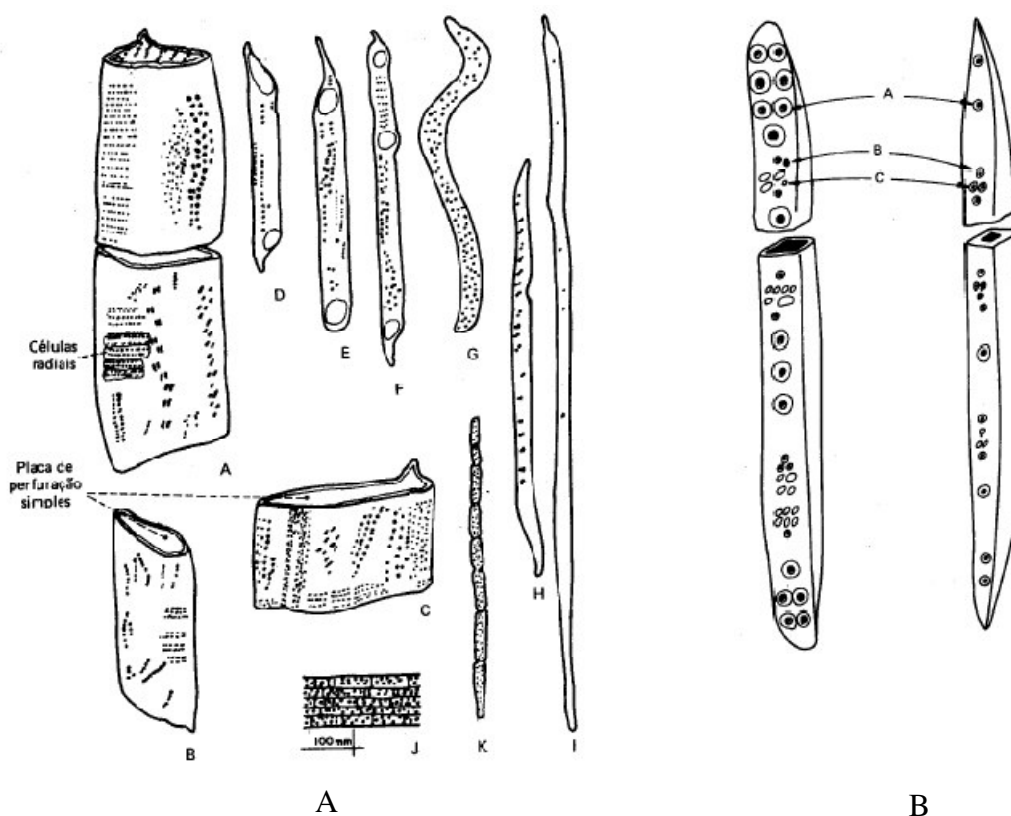


Figura 2 - A - Elementos constituintes da madeira de uma folhosa: A, B, C – elementos de vaso largos; D, E, F – elementos de vaso estreitos; G – traqueídeos; H – fibrotraqueóide; I – fibra libriforme; J – células de parênquima radial; K – células de parênquima axial. B - Elementos constituintes da madeira de uma resinosa: Traqueídeos de lenho inicial e tardio. A – pontuações areoladas entre traqueídeos; B – pontuações areoladas entre traqueído axial e radial; C – pontuações pinóides entre traqueído e raio parenquimático (9, 10).

Nas folhosas as células de condução são denominados como vasos e as de suporte como fibras. Nas resinosas estas células são denominadas por traqueídeos (que desempenham o papel de condução e de suporte). As fibras das resinosas e das folhosas apresentam características diferenças (Figura 2) (9, 11-14).

A parede celular das fibras é constituída por uma parede primária (que contém celulose, hemiceluloses, pectinas e proteínas completamente rodeados por lenhina) e por uma parede secundária (que contém essencialmente celulose e hemicelulose).

A parede primária, de espessura fina, é constituída por fibrilas de direcção aleatória, sem organização e pouco regular. Já a parede secundária, com um espessamento considerável, de 1 a 10 μm , apresenta várias camadas com diferentes direcções, bem

definidas e helicoidais, sendo esta organização e a diferença de direcções as responsáveis pela rigidez e resistência da fibra (Figura 3) (12-14). Entre as células pode-se encontrar ainda uma zona altamente lenhificada, a lamela média, que funciona como o elemento de aglutinador das fibras (Figura 3).

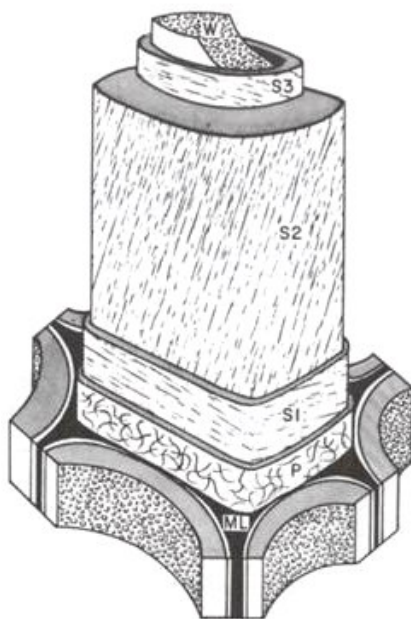


Figura 3 - Esquema simplificado da ultraestrutura da parede celular de uma fibra adulta. ML – Lamela média, P – Parede primária, S1 – Camada externa da parede secundária, S2 – Camada intermédia da parede secundária, S3 – Camada interna da parede secundária e W – camada rugosa (14).

A parede celular da fibra tem, como base, o agrupamento das moléculas de celulose em feixes formando as fibrilas elementares, com zonas cristalinas (cristalitos) alternadas com zonas amorfas. As fibrilas elementares, por sua vez, associam-se em microfibrilas. Alguma hemicelulose começa a aparecer aqui, entre as várias fibrilas elementares que constituem a microfibrila. As microfibrilas, ou fibrilas, aparecem no nível acima da organização da parede celular e são constituídas por um conjunto de microfibrilas. Entre as várias microfibrilas encontra-se uma zona rica em lenhina e hemiceluloses. São estas fibrilas que vão formar a parede celular das fibras em camadas (Figura 4).

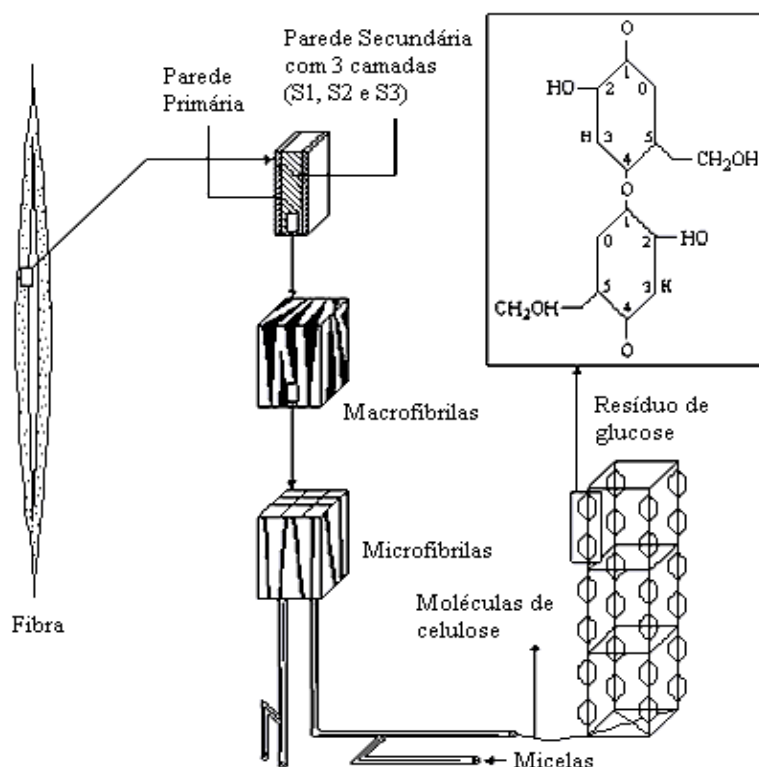


Figura 4 – Estrutura de uma fibra de celulose (13).

Os constituintes principais das células da madeira são a celulose, as hemiceluloses e a lenhina (Figura 5). Na madeira, a concentração de lenhina é superior na lamela média (localizada entre células) e na parede primária, as hemiceluloses encontram-se concentradas na camada S1 e na parte exterior da camada S2 da parede secundária e a celulose encontra-se preferencialmente no interior da camada S2 e na S3 da parede secundária (Figura 3 e Figura 6) (9, 13-15). É possível encontrar na madeira complexos de lenhina-hidratos de carbono, especialmente entre a lenhina e as hemiceluloses e também hemicelulose-celulose (16, 17).

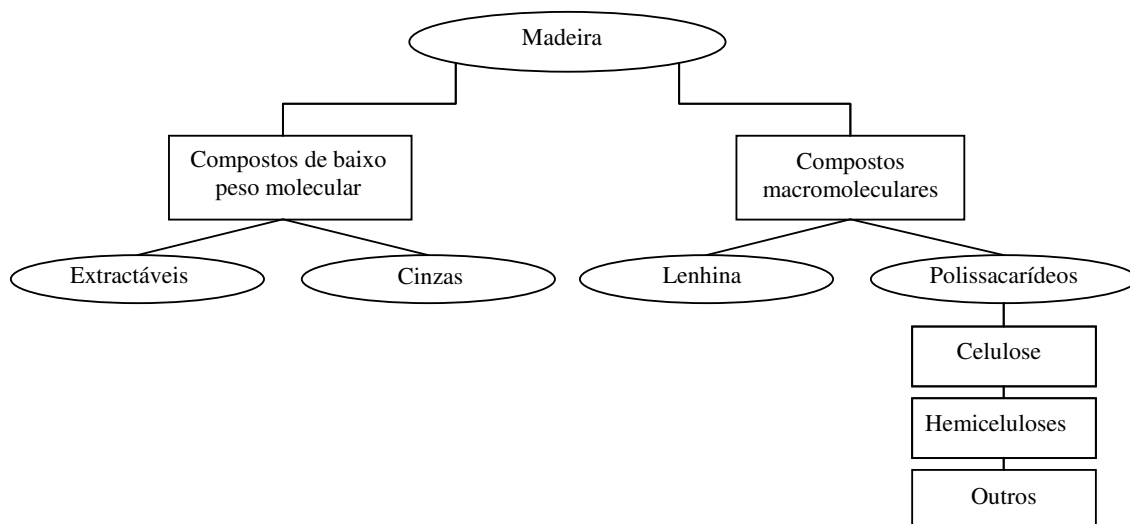


Figura 5 – Esquema geral da composição química da madeira

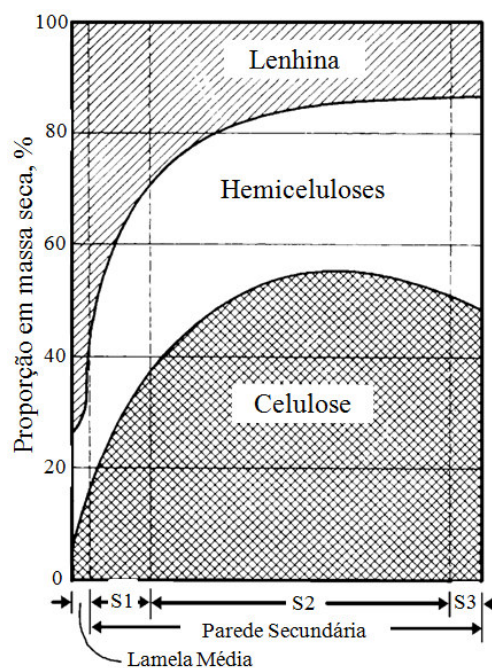


Figura 6 – Distribuição dos componentes principais ao longo da parede celular da fibra de uma resinososa (18).

Para além destes constituintes principais existem ainda na estrutura da madeira uma série de constituintes orgânicos que podem ser extraídos através de um conjunto de solventes orgânicos, como o etanol, acetona e diclorometano – os extractáveis (Figura 5). Os extractáveis, que representam uma pequena fracção da madeira (2-5%), são compostos de baixo peso molecular e estão, maioritariamente, depositados fora da parede celular.

Embora se encontrem em pequenas quantidades, apresentam um papel bastante importante no metabolismo das árvores, pois alguns destes extractáveis ajudam a proteger as árvores de fungos e insectos. Os extractáveis englobam compostos do tipo: terpenos, gorduras, ceras (álcoois de maior peso molecular), ácidos e álcoois gordos, estilbenos, flavonóides, esteróis, taninos e muitos outros.

É possível encontrar ainda uma pequena quantidade de componentes inorgânicos (<1%) sendo vulgarmente quantificados como cinzas (Figura 5). São constituídos principalmente por sais: sulfatos, oxalatos, carbonatos, fosfatos e silicatos de cálcio, potássio e magnésio.

Tabela 1 – Os constituintes principais das folhosas, das resinosas e do *E. globulus* em percentagem de madeira seca. Valores médios de árvores típicas usadas na pasta (15, 19, 21).

Constituintes	Valor médio nas folhosas	Valor médio nas resinosas	<i>Eucalipto</i> (<i>E. globulus</i>)
Celulose	39-45	37-43	51,3
Glucuronoxilana	15-30	-----	19,9
Arabinoglucuronoxilana	-----	5-10	
Glucomanana	2-5	-----	1,4
Galactoglucomanana	-----	15-20	
Lenhina	20-25	25-33	21,9
Extractáveis	2-4	2-5	2,5

A composição da madeira varia com o tipo de árvore, as folhosas normalmente apresentam maiores teores de celulose e menores quantidades de lenhina que as resinosas. As hemiceluloses maioritárias que constituem as folhosas e as resinosas são também diferentes (Tabela 1). O *Eucalyptus globulus*, dentro das folhosas e das do género *Eucalyptus*, é das árvores que apresenta maiores teores de celulose e teores de lenhina e de hemiceluloses relativamente baixos (19-21) (Tabela 1).

A constituição da madeira e as características dos seus componentes é muito importante quando se fala no processo de fabricação de pasta, podendo condicionar as características finais da pasta assim como o rendimento final do cozimento.

2.1.1 A Celulose

A celulose é a estrutura base das células das plantas e como tal é a mais importante substância natural produzida por organismos vivos e está distribuída em todas as plantas, desde as árvores mais desenvolvidas até aos organismos mais primitivos.

A celulose é o constituinte principal da madeira e é um homopolissacarídeo constituído por aproximadamente 8000-10000 unidades de β -D-glucopiranoses ligadas entre si por ligações glicosídicas (1 \rightarrow 4). As moléculas de celulose são completamente lineares, resultante das ligações β -glicosídicas e consequente formação da unidade estrutural que se repete, o dissacarídeo denominado Celobiose, constituído por duas unidades de glucose com uma rotação de 180° entre si. A posição β do grupo hidroxilo que se estabelece entre as unidades de glucose é a única que permite o alongamento linear que se verifica na cadeia de celulose (Figura 7) (15, 22-24). Na cadeia de celulose, a conformação do anel da unidade de glucose é a conformação em cadeira, que energeticamente é a mais estável.

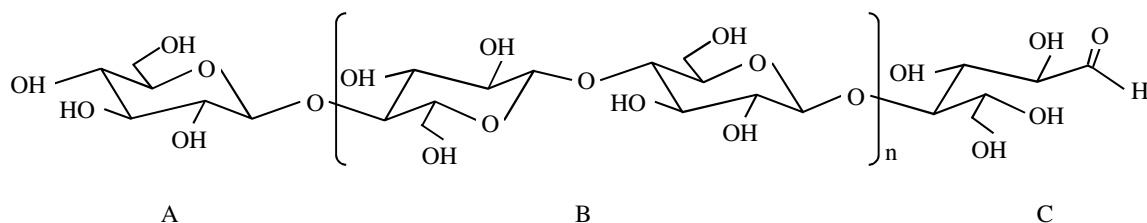


Figura 7 – Modelo estrutural da Celulose. A – terminal não redutor, B – unidade de celobiose, C – terminal redutor

A molécula de celulose apresenta numa das extremidades um terminal que exhibe propriedades redutoras - terminal redutor - e na outra extremidade um terminal sem propriedades redutoras - terminal não redutor - esquematizados na Figura 7 (15, 22). Cada unidade D-anidroglicopiranosose da molécula de celulose possui 3 grupos hidroxilos livres nas posições C2, C3 e C6 (Figura 7), capazes de se envolverem em ligações de hidrogénio inter e intra-moleculares. Como tal, as moléculas de celulose apresentam uma forte tendência em formarem este tipo de ligações, resultando na estrutura primária fibrilar elementar.

A celulose é um polímero amorfo-cristalino onde é possível encontrar duas zonas distintas na sua estrutura. Algumas regiões estão sob a forma cristalina (com uma estrutura altamente ordenada) e outras regiões estão sob a forma amorfa (com uma estrutura bastante desordenada). Como consequência da sua estrutura fibrosa mais densa, rígida e mais resistente à tracção, devido às fortes ligações de hidrogénio, a celulose tem uma força de tensão elevada, baixa reactividade química e baixa capacidade de absorção, tornando-se insolúvel na maioria dos solventes.

2.1.2 As hemiceluloses

As hemiceluloses, assim como a celulose e as pectinas, pertencem aos componentes estruturantes das paredes celulares das plantas superiores, onde estão associadas a proteínas e compostos fenólicos.

Inicialmente, pensava-se que o papel das hemiceluloses era o de criar ligações entre a celulose e a lenhina, mas hoje pensa-se que as hemiceluloses funcionam como reguladoras da agregação da celulose (25-30).

Dependendo da planta e do tipo de célula, as hemiceluloses podem variar bastante tanto na sua composição como na sua estrutura. As hemiceluloses podem ser, assim como a celulose, homopolímeros (contém apenas um tipo de monossacarídeo na cadeia principal), ou heteropolímeros (contendo mais do que um tipo monossacarídeo na cadeia principal) e apresentam cadeias bastante mais curtas e com diversos grupos substituintes como ramificações. Estes polissacarídeos são facilmente hidrolisados em meio ácido, resultando nos seus componentes monoméricos principais (a D-glucose, a D-manose, a D-xilose, D-galactose e a L-arabinose) e noutros componentes residuais como a L-ramnose, o ácido D-glucurónico, o ácido D-galacturónico e o ácido 4-O-metil-D-glucurónico. Estas unidades, que compõem as hemiceluloses, podem ser subdivididas em pentoses, hexoses, ácidos hexurónicos e deoxi-hexoses (Figura 8) (15, 30-32).

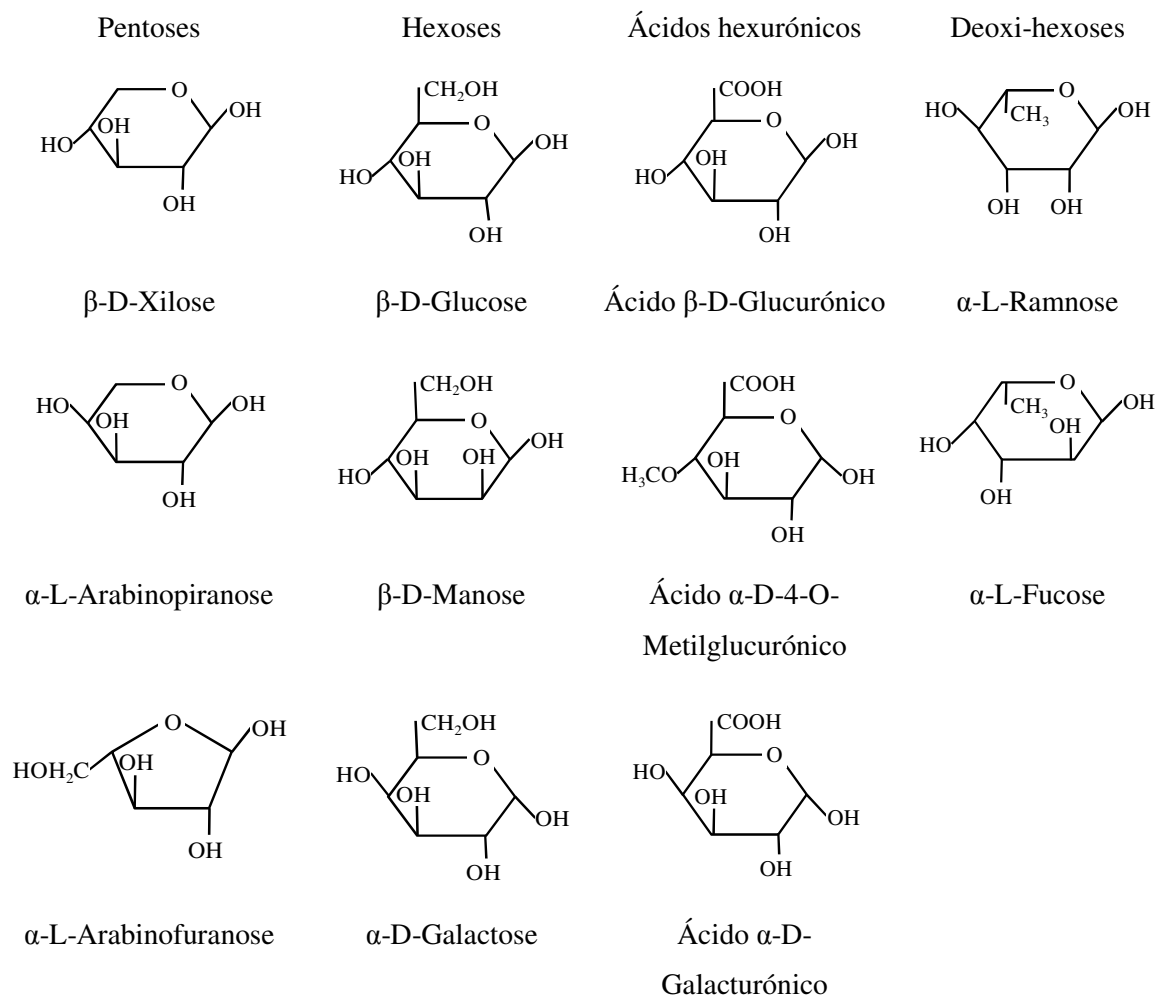


Figura 8 – Fórmulas dos monossacarídeos constituintes das hemiceluloses (31).

Consoante a unidade da cadeia principal, as hemiceluloses podem ser divididas em quatro grandes grupos: as xilanas, as mananas, as xiloglucanas e as glucanas (15, 30).

2.1.2.1 As xilanas

As xilanas são o tipo de hemicelulose mais abundante na natureza, em que a cadeia principal é composta por unidades de D-xilopiranoses. Dentro deste grupo encontramos as homoxilanas, polissacarídeos lineares compostos por unidades de D-xilopiranoses ligadas por ligações $\beta(1\rightarrow3)$, $\beta(1\rightarrow4)$ ou uma mistura destas ligações $\beta(1\rightarrow3, 1\rightarrow4)$ (Figura 9) (30).

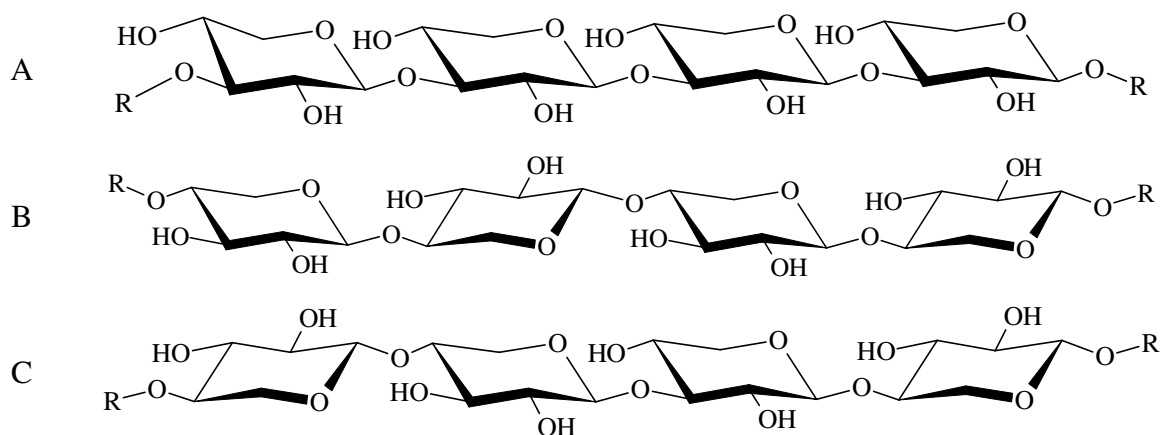


Figura 9 – Estrutura das cadeias de homoxilanas. A – ligações $\beta(1 \rightarrow 3)$, B- ligações $\beta(1 \rightarrow 4)$, C- mistura de ligações $\beta(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 4)$ (30).

As glucuronoxilanas são outro tipo de xilanas existentes na natureza. Este tipo de hemicelulose é a mais comum de entre as plantas com um nível de evolução superior, e encontra-se na parede secundária das células (Figura 10) (30).

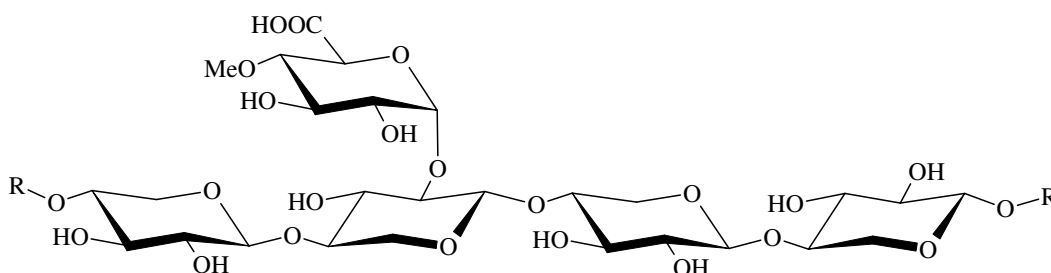


Figura 10 – Estrutura primária da 4-O-metil-glucuronoxilana (30).

Embora haja variações qualitativas e quantitativas entre as diferentes folhosas, no que se refere à composição das hemiceluloses, esta é a xilana principal deste grupo de árvores, mais especificamente uma O-acetil-4-O-metil-glucurono- β -D-xilana. Esta representa cerca de 90% das hemiceluloses presentes na árvore. Entre as espécies de folhosas, e mais especificamente entre a espécie de Eucalyptus, o *E. globulus* é o que contém um teor de hemiceluloses menor, mais concretamente de xilanas (cerca de 20%), resultado essencialmente do seu alto teor de celulose (Tabela 1) (19, 21, 33).

A O-acetil-4-O-metil-glucurono- β -D-xilana consiste em unidades de β -D-xilopiranosose ligadas linearmente entre si por ligações $\beta(1 \rightarrow 4)$. Esta xilana apresenta em grande parte das unidades D-xilopiranososes grupos acetilo no carbono 2 e/ou 3 numa

proporção média de 7 acetilos por 10 de xilose e ligações ao ácido α -D-glucurónico ou ao seu derivado, o ácido 4-O-metil- α -D-glucurónico (MeGlcA), por ligações $\alpha(1\rightarrow2)$ com uma razão molar entre os grupos MeGlcA e as unidades de D-xilopiranoses que varia de 1:4 e 1:16, sendo em média de 1:10 (31, 33-35).

Foi encontrada, no *E. globulus*, uma xilana bastante estável e peculiar pois contém, além dos componentes principais das xilanas, quantidades consideráveis de galactose, glucose, arabinose e ramnose (8, 36) (Figura 11).

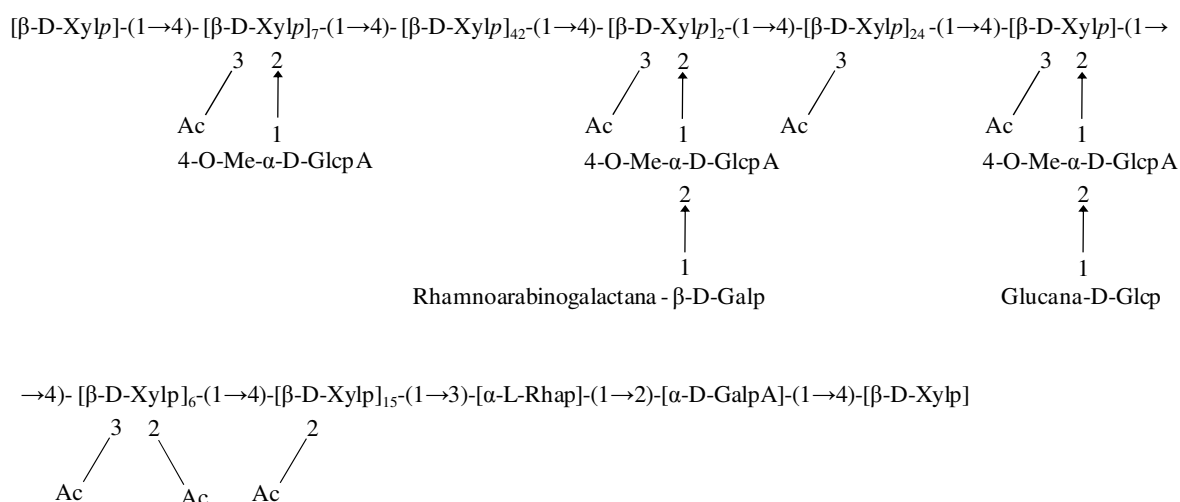


Figura 11 – Modelo estrutural da hemicelulose principal do *Eucalyptus globulus* (8).

Normalmente as glucuronoxilanas apresentam um grau de polimerização entre 200 e 300 (dependendo da espécie) com pesos moleculares médios de 5600-40000 e apresentam-se sob a forma amorfa (15, 24, 31, 32, 37, 38). A xilana do *E. globulus* apresenta um grau de polimerização médio de 160, com um peso molecular médio de 25600-36300 Da (8, 36).

As glucuronoxilanas das folhosas contêm ainda na sua extremidade redutora, unidades de ramnose e ácido galacturónico, dando-lhe uma estabilidade adicional em meio alcalino (Figura 12) (31, 32, 39-42).

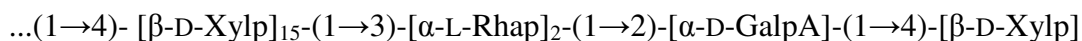


Figura 12 – Estrutura terminal das xilanas.

É possível encontrar também, as (arabino)glucuronoxilanas. As arabino-4-O-metilglucuronoxilanas são as segundas hemiceluloses existentes nas resinosas e correspondem a 5-10% da madeira (especialmente nas resinosas das zonas temperadas). Nas zonas tropicais estas xilanas podem chegar a 50% das hemiceluloses existentes na árvore. Estas últimas são mais ricas em unidades laterais de α -L-arabinofuranose (30, 43, 44).

Analogamente à xilana das folhosas, as arabinoglucuronoxilanas são constituídas por uma cadeia ramificada de β -D-xilopiranosose ligadas linearmente entre si por ligações $\beta(1\rightarrow4)$, substituída por grupos MeGlcA na posição 2 (com uma média de 2 grupos ácidos por cada 10 xiloses) e por grupos α -L-arabinofuranose na posição 3 (com uma média de 1,3 arabinoses por cada 10 unidades de xilose) (Figura 13) (30).

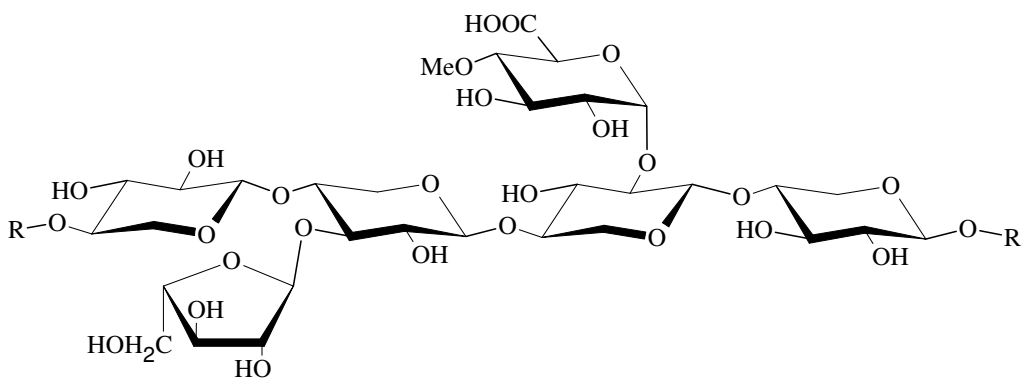


Figura 13 – Estrutura da (L-arabino)-4-O-metil-glucuronoxilana (30).

Ao contrário da xilana anterior, as (arabino)glucuronoxilanas não contêm grupos acetilo mas contém uma quantidade superior de grupos MeGlcA. Esta xilana tem também um grau de polimerização inferior à glucuronoxilanas das folhosas, cerca de 130 (24, 30-33). Assim como nas xilanas das folhosas, também foi encontrada nas arabinoglucuronoxilanas a mesma sequência final de açúcares (Figura 12) (45).

Dentro do grupo das xilanas podem-se encontrar ainda as arabinoxilanas, que são hemiceluloses existentes em sementes e grãos. Esta xilana é composta por uma cadeia linear de unidades de β -D-xilopiranosose ligadas linearmente entre si pelas ligações $(1\rightarrow4)$ com grupos α -L-arabinofuranosil ligados nas posições 2 e/ou 3.

Encontram-se também as (glucurono)arabinoxilanas, que são as hemiceluloses maioritárias nos tecidos lenhificados de ervas e cereais. Estas contêm grupos MeGlcA e α -L-arabinofuranose ligados à cadeia principal de β -D-xilopiranoses.

Um último tipo de xilanas existente na natureza são as heteroxilanas, que como o próprio nome indica são xilanas com estruturas onde a cadeia principal de $\beta(1\rightarrow4)$ -xilana está bastante substituída por cadeias laterais de diferentes mono e oligossacarídeos (30).

2.1.2.2 As mananas

Dentro deste tipo de hemicelulose pode-se encontrar as galactomananas, presentes essencialmente nas paredes celulares dos tecidos de armazenagem.

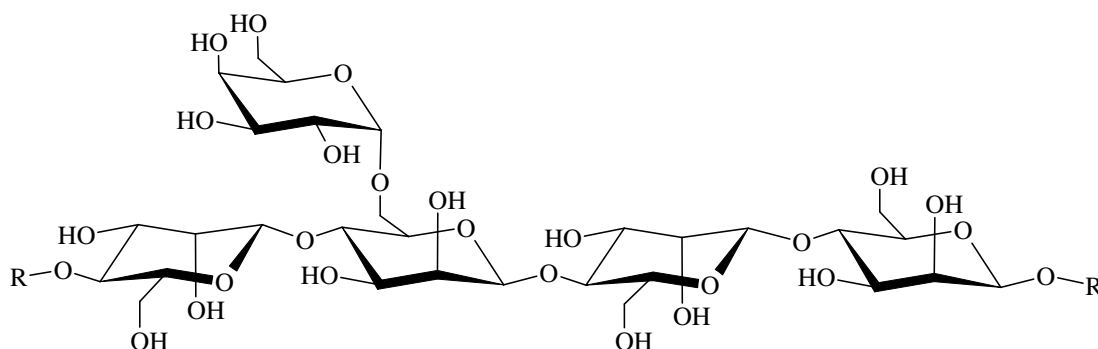


Figura 14 – Estrutura primária da D-galacto-D-manana (30).

Esta manana tem uma cadeia principal de D-manopiranoose, ligadas por ligações $\beta(1\rightarrow4)$, substituída na posição 6 por unidades α -D-galactopiranoose (Figura 14). Dependendo do grau de substituição é mais ou menos solúvel em água. As galactomananas com poucas cadeias laterais (com aproximadamente 4% de unidades α -D-galactopiranoses) são insolúveis enquanto as que têm um grau de substituição de 30-96% são solúveis (30).

Outro tipo de mananas são as glucomananas e as (D-galacto)-glucomananas. Esta hemicelulose contém, além das unidades de D-manopiranoose, unidades de D-glucopiranoose na cadeia principal, ligadas entre si por ligações $\beta(1\rightarrow4)$ e apresentam um grau de polimerização aproximadamente da ordem de 70-100. A razão molar entre as unidades de D-glucopiranoses e de D-manopiranoses é variável, dependendo apenas da espécie da

madeira. Nas galactoglucomananas encontra-se ainda unidades de α -D-galactopiranosose ligadas na posição 6 das unidades de D-manopiranosose, com um teor de galactose superior a 15%. As hemiceluloses deste tipo, com teores de galactose mais baixo, são classificadas como glucomananas. Em algumas (D-galacto)-glucomananas é possível encontrar ainda grupos acetilo ligados às unidades de glucose e/ou às unidades de manose (Figura 15) (30-32, 43, 44).

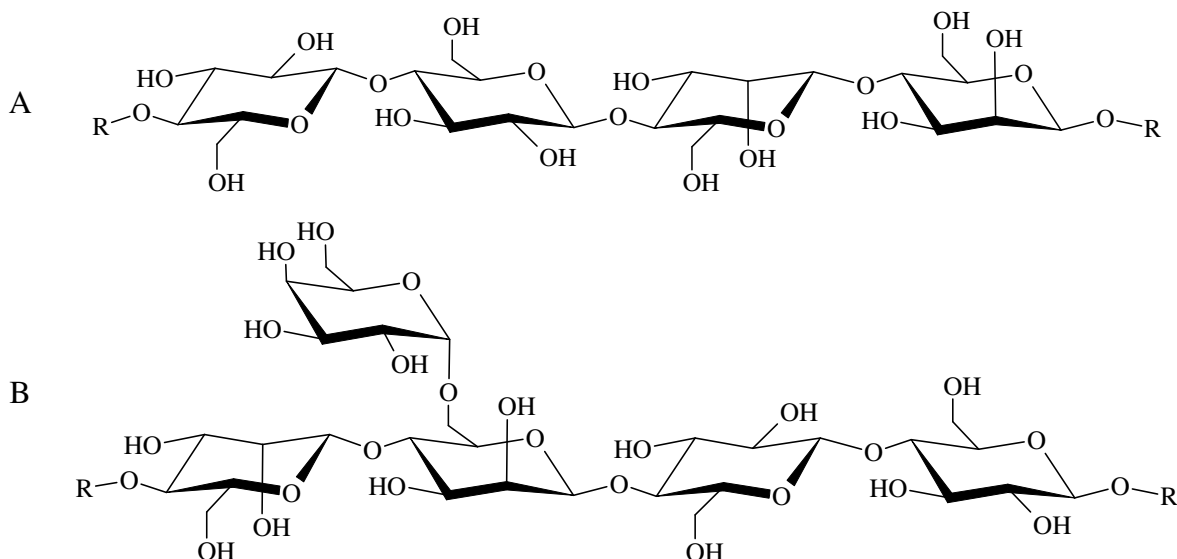


Figura 15 – Estrutura da D-gluco-D-manana (A) e (D-galacto)-D-gluco-D-manana (B) (30).

As galactoglucomananas são as hemiceluloses maioritárias da parede celular secundária das resinosas (15-20% da madeira), embora também se encontre as glucomananas nas folhosas em pequenas quantidades (2-5%) (Tabela 1). A O-acetil-galactoglucomanana existente nas resinosas apresenta razões entre a manose e glucose de aproximadamente 3:1, distribuídas aleatoriamente, enquanto que a glucomanana existente nas folhosas apresenta razões entre as unidades de D-manopiranoses e D-glucopiranoses que podem ir de 1,5 a 2,1, para a maioria das espécies. Foi encontrada a razão de 1 para a *Betula papyrifera* e para a *Betula lutea* (24, 30, 31, 46-52).

As glucomananas, devido à sua similaridade com a celulose, estão fortemente associadas à celulose e como tal são difíceis de se extrair (consegue-se apenas com soluções alcalinas) mas as galactoglucomananas são bastante mais acessíveis e hidrolisáveis (24, 30).

2.1.2.3 As glucanas

Além da celulose, existem na madeira outros polissacarídeos constituídos por glucose. As glucanas são constituídas por uma cadeia linear de β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 4)-D-glucopiranosose em que as ligações (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) são alternadas e aleatórias, havendo segmentos da cadeia apenas com ligações (1 \rightarrow 4), alternadas por uma ligação (1 \rightarrow 3). Estas glucanas, sendo idênticas à celulose, associam-se fortemente à celulose das microfibrilas, especialmente as glucanas com segmentos de cadeia com ligações (1 \rightarrow 4) mais longos. São hemiceluloses que existem em maiores quantidades na madeira de compressão (2%) e em quantidades vestigiais na madeira normal (Figura 16) (24, 31, 53, 54).

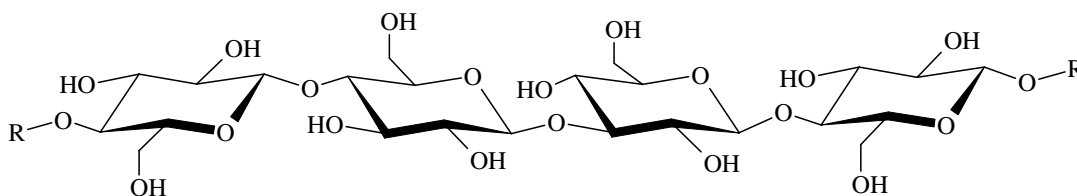
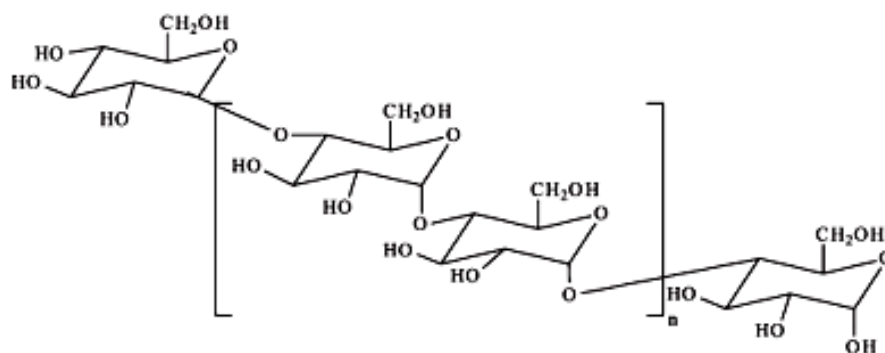
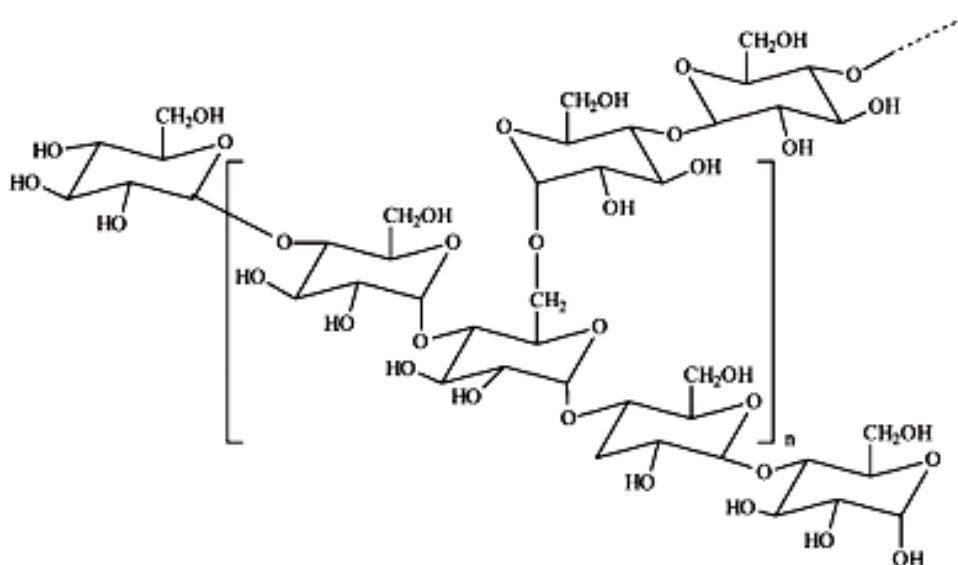


Figura 16 – Estrutura de uma β -D-glucana com uma mistura de ligações β (1 \rightarrow 3) e β (1 \rightarrow 4) (30).

Neste grupo encontra-se uma glucana bastante especial, o amido. O amido existe em pequenas quantidades tanto em madeiras de resinosas como de folhosas. O amido, entre os outros polissacarídeos de glucose, é o polissacarídeo de reserva mais importante e é possível encontrá-lo armazenado nas células de parênquima dos tecidos da madeira. O amido é uma glucana cujas ligações existentes entre as unidades de D-glucopiranosose são do tipo α (1 \rightarrow 4) e α (1 \rightarrow 4,6) (11).



A



B

Figura 17 – Estrutura da amilose (A) e da amilopectina (B).

O amido é constituído por dois componentes, que são diferentes tanto ao nível do peso molecular como ao nível da estrutura molecular. Assim como a celulose, a componente amilose do amido é uma α -glucana linear com 99% de ligações $\alpha(1\rightarrow4)$ e algumas ligações $\alpha(1\rightarrow6)$, apresenta-se sob a forma helicoidal tanto no estado sólido como por vezes em solução (Figura 17-A). A amilopectina (a outra componente do amido) é altamente ramificada e apresenta uma solubilidade bastante elevada, visto não poder formar agregados. A amilopectina é uma molécula maior que a amilose com aproximadamente 95% de ligações $\alpha(1\rightarrow4)$ e 5% de ligações $\alpha(1\rightarrow6)$ (Figura 17-B).

O amido, ao contrário da celulose, não forma fibrilas, apresenta-se apenas em grânulos, resultado da estrutura helicoidal de 6 unidades de glucose por volta (24, 31, 55).

2.1.2.4 As galactanas

As galactanas são outro tipo de hemicelulose bastante conhecida, especialmente as arabinogalactanas. Estas hemiceluloses são por vezes denominadas como pectinas. Este tipo de hemicelulose existe nas resinosas em quantidades muito pequenas. Estes polissacarídeos são solúveis em água e são constituídos por uma cadeia linear principal de β -(1 \rightarrow 3)-D-galactopiranoose com ramificações bastante frequentes de unidades de galactopiranoose e/ou L-arabinofuranose através de ligações β -(1 \rightarrow 6). Por vezes também se encontra unidades de ácido glucurónico como ramificação destes polissacarídeos. Nas folhosas as galactanas são caracterizadas por conterem algumas unidades de ramnose (30-32, 56-59).

Na madeira de compressão encontra-se também quantidades consideráveis de (1 \rightarrow 4)- β -D-galactana (10%) (24, 54).

De uma forma resumida pode-se dizer que as folhosas e as resinosas têm na sua constituição diferentes tipos de hemiceluloses e em quantidades variadas (dependendo essencialmente da espécie da madeira). As hemiceluloses são sem dúvida um componente bastante importante na constituição da madeira e apresenta uma variedade de características que são relevantes para o seu comportamento durante o cozimento kraft e para a sua dissolução no licor de cozimento utilizado. A xilana, sendo a hemicelulose maioritária das folhosas, é a hemicelulose mais importante do *E. globulus*. Além da sua estrutura peculiar e do seu grau de polimerização, esta xilana existe em quantidades consideráveis na madeira. Depois do cozimento kraft esta xilana poderá possuir características que permita ponderar a sua recuperação do licor negro.

2.1.3 A lenhina

A lenhina, a seguir à celulose é o componente polimérico mais abundante e importante no mundo das plantas. A lenhina oferece a resistência mecânica aos tecidos das plantas e é responsável pela coesão das fibras na madeira. A composição da madeira em lenhina pode variar de 20-40% e depende de espécie para espécie (60, 61).

A lenhina é uma macromolécula aromática amorfa, altamente ramificada e complexa, constituída por unidades de fenilpropano ligadas entre si essencialmente por ligações éter e por ligações carbono-carbono (menos abundantes). Pode ser definida como um material polifenólico resultante da polimerização dos seus três precursores - álcoois p-cumarílico, coniferílico e sinapílico (Figura 18) (60, 61). A designação atribuída a cada átomo da unidade de fenilpropano está identificada na Figura 18.

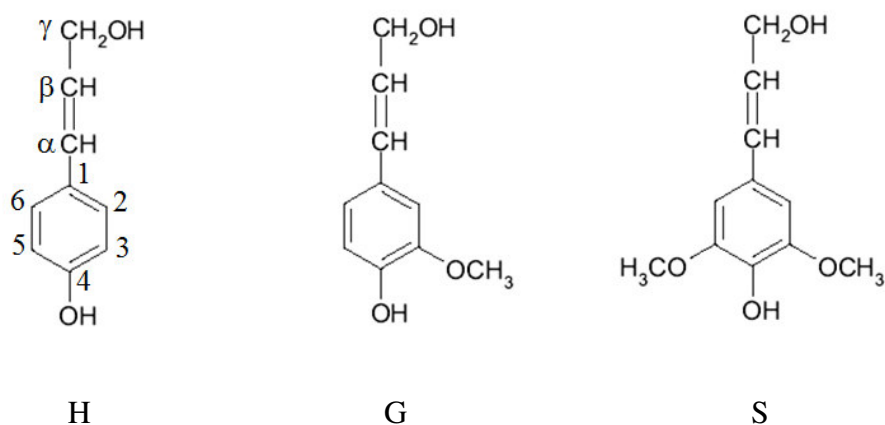


Figura 18 – Precursores da lenhina. H - álcool p-cumarílico, G - álcool coniferílico, S - álcool sinapílico.

A lenhina das folhosas, designadas como lenhina de guaiacilo-seringilo, ou do tipo G/S, é composta por unidades derivadas principalmente dos álcoois coniferílico e sinapílico com uma composição variada nas suas razões (40-80% de unidades S, 20-60% de unidades G e 4-10% de unidades H). Nestas árvores encontra-se uma grande quantidade de unidades G na lamela média enquanto que na camada S2 é possível encontrar unidades S e unidades G em quantidades mais equilibradas. Neste tipo de lenhinas a razão de grupos metoxilo por unidade fenilpropano é de 1,2 a 1,5 (60, 62-64).

A lenhina do *E. globulus* apresenta algumas diferenças, a nível estrutural, que distingue esta árvore das outras folhosas. As ligações envolvidas nas lenhinas são principalmente do tipo β -O-4 (as folhosas com 50-60% destas ligações e o *Eucalyptus globulus* com 58%), a proporção unidades não condensadas/condensadas é de cerca de 78/22, e a proporção S:G:H é aproximadamente 84:15:1. A proporção S:G:H da lenhina do *E. globulus* mostra que esta é do tipo S (65).

As lenhinas das resinosas são conhecidas como lenhinas guaiacilo, ou do tipo G, visto derivarem principalmente do álcool coníferico (95-98% de unidades G e 2-5% de unidades H)

Sabe-se que a lenhina está ocasionalmente ligada aos polissacarídeos (complexos lenhina-polissacarídeos), principalmente através da arabinose, xilose e galactose. É a estabilidade destas ligações que justifica a dificuldade que existe em retirar a lenhina residual das pastas (61, 66, 67).

Tabela 2 – Tipos e abundâncias das ligações mais importantes na lenhina das resinosas e das folhosas (61-63, 67-69).

Tipo de ligação	Resinosas	Folhosas
β -O-4	45-50	50-60
α -O-4	6-8	6-8
β -5	9-15	4-6
β -1	2-3	5-15
5-5	10-11	2-5
4-O-5	2-4	2-3
β - β	2-4	3-7

As ligações tipo, dominantes nas lenhinas das folhosas e das resinosas, são as α -aril éter (em unidades fenólicas) e β -aril éter (em unidades fenólicas e não fenólicas), e é através da quebra destas ligações que se dá a degradação da lenhina no licor de cozimento (62, 67, 68, 70-74). As ligações β -O-4 são as ligações predominantes das lenhinas das resinosas e das folhosas, sendo cerca de 50% de todas as ligações da lenhina das resinosas e quase 60% das ligações da lenhina das folhosas (60, 63, 67, 75) (Tabela 2).

2.2 O PROCESSO KRAFT

O principal objectivo do cozimento da madeira é a separação das fibras celulósicas e consequente remoção da lenhina. Existem vários processos mecânicos ou químicos que se podem utilizar para a remoção da lenhina e separação das fibras celulósicas. Os processos químicos podem ser ácidos – processo ao sulfito (usa o ácido sulfuroso e o ião bissulfito como agente activo no cozimento), ou alcalinos – processo à soda (tem como agente activo do cozimento o hidróxido de sódio) e processo ao sulfato ou kraft (tem como agentes activos o hidróxido de sódio e o sulfureto de sódio).

O processo kraft é, a nível mundial, e especialmente a nível nacional, o processo de eleição para o fabrico de pasta química para papel. Este processo traz uma série de vantagens em relação aos outros processos químicos. Além de ser um processo bastante flexível no sentido de ser aplicável a uma grande variedade de madeiras, permite recuperar os reagentes químicos utilizados e usar tempos de cozimento menores, preservando as características das fibras da madeira. De um modo geral os papéis produzidos por este processo têm maiores resistências físico-mecânicas (76).

O processo kraft já evoluiu bastante desde os tempos em que este era realizado em digestores tipo autoclave em processos descontínuos (77). Hoje em dia o cozimento é realizado em digestores contínuos, optimizando-se os tempos mortos que se obtinham entre descargas e enchimentos do digestor descontínuo. O processo contínuo permite obter melhor qualidade na pasta para rendimentos mais elevados, minorar o consumo de vapor para o aquecimento e minorar as quantidades de alcali para uma mesma quantidade de madeira processada.

O processo kraft contínuo apresenta várias fases: alimentação e pré-impregnação, aquecimento e impregnação, pré-cozimento, cozimento, lavagem em contra-corrente e descarga. No fim dos anos 70 início dos anos 80 surgiram os cozimentos estendidos que aproveitam a zona de contra-corrente para, além da lavagem, criar condições tais que permitam estender o cozimento, permitindo assim utilizar condições menos drásticas na parte superior do digestor (77-79).

O cozimento propriamente dito pode ser separado em várias fases: a fase inicial, período de aquecimento do digestor e onde a temperatura atinge os 140°C, a fase principal,

que engloba o fim do período de aquecimento e o patamar de temperaturas por volta dos 160-170°C e é quando ocorrem a maioria das reacções de deslenhificação e a fase residual, fase final do cozimento (76).

2.2.1 Cozimento kraft

No processo kraft o licor de cozimento inicial, também conhecido como Licor Branco ou Lixívia Branca, é uma solução aquosa composta por hidróxido de sódio (NaOH) e sulfureto de sódio (Na₂S). O licor de cozimento tem como função principal a deslenhificação da madeira, que num sentido mais alargado inclui todos os processos que resultam na remoção parcial ou total da lenhina da madeira. Os reagentes activos neste processo são os iões OH⁻ e HS⁻. Na solução usada como licor branco, estão presentes os seguintes equilíbrios químicos:



Sendo o valor das constantes de equilíbrio aproximadamente de $K_1 = 10$ e $K_2 = 10^{-7}$, pode-se concluir que na solução e nas condições do processo kraft o ião predominante é o HS⁻, e de forma a facilitar os cálculos e o entendimento das reacções pode-se mesmo considerar que o ião S²⁻ e H₂S estão ausentes da solução (80-82).

Os parâmetros principais a controlar no licor de cozimento são o seu Alkali Activo (AA), o seu Alkali Efectivo (AE), o seu Índice de Sulfureto (IS) e a sua Actividade (Act) (ver capítulo 3.1.2). O controlo rigoroso destes parâmetros é extremamente importante pois têm um papel preponderante no cozimento, influenciando tanto o grau de deslenhificação atingido no final como à qualidade da pasta obtida. No processo kraft o licor branco apresenta normalmente um pH inicial de 13-14 e uma concentração de NaOH que varia de 20-80g/L. Desta forma garante-se uma alcalinidade elevada no fim do cozimento pH≈11,

de forma a se evitar a precipitação e as reacções de condensação da lenhina. Tipicamente, o AE residual deverá ser superior a 3 g de Na₂O/L (80-82).

2.2.1.1 Reacções da lenhina

Na deslenhificação a lenhina fragmenta-se diminuindo o seu peso molecular, que só por si, a torna mais hidrofílica, o que facilita a sua solubilização no licor de cozimento. A fragmentação da lenhina depende essencialmente das várias estabilidades e comportamentos das ligações e estruturas que a compõem. As ligações carbono-carbono são ligações muito estáveis e difíceis de quebrar mas a maioria das ligações éter (carbono-oxigénio) são facilmente quebradas em meio alcalino por ataque nucleófilo. É essencialmente através destas ligações que se dão as fragmentações da estrutura complexa e ramificada da lenhina (60, 62, 67, 68, 70-74).

As ligações que se clivam mais facilmente são as do tipo α -aril éter das unidades fenólicas da lenhina, pois necessitam apenas do meio alcalino para quebrarem (Figura 19). As fracções da lenhina de menor peso molecular são rapidamente dissolvidas no licor ainda na fase de aquecimento do reactor (a temperaturas inferiores a 110°C) (62, 72, 74, 83-85).

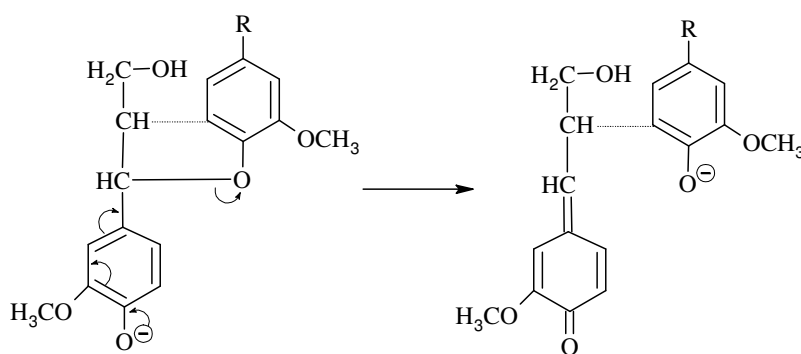


Figura 19 – Clivagem da ligação α -aril éter da unidade fenólica. Possível ligação β -arilo que impossibilita a separação das duas unidades (linha a tracejado) (68, 74).

As ligações β -aril éter das unidades fenólicas também são facilmente quebradas, embora esta clivagem pressuponha a presença de iões HS⁻. Estas reacções ocorrem entre os 110°C e os 140°C (86-88).

As reacções de deslenhificação envolvem mecanismos do tipo nucleófilo, justificando a utilização do sulfureto de sódio. Os iões HS^- , embora sejam bases fracas, têm um carácter nucleófilo suficientemente forte para quebrar esta ligação (Figura 20) (62, 68, 72, 74, 85, 89).

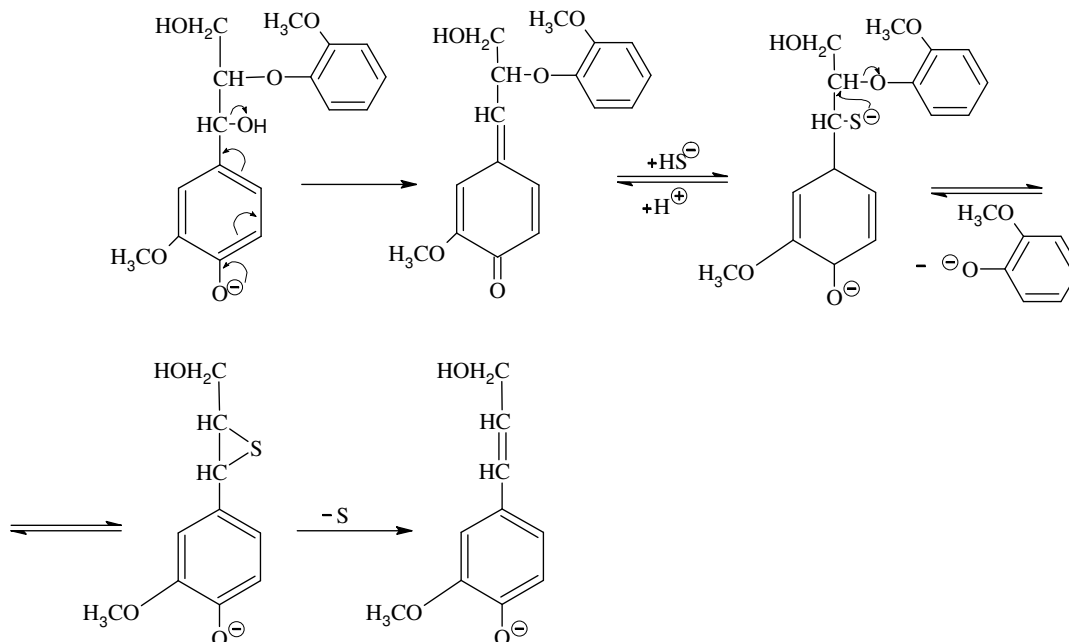


Figura 20 – Reacção do ião HS^- com a lenhina (68, 72, 74).

As ligações β -aryl éter de unidades não fenólicas quebram mais lentamente e requerem condições mais drásticas, depois de se atingir a temperatura de cozimento (Figura 21) (72).

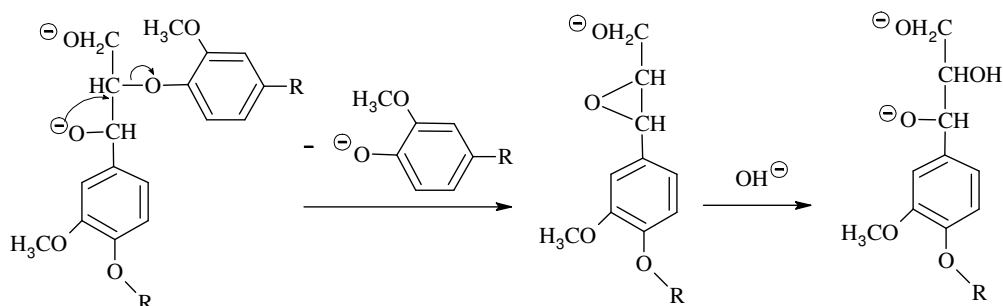


Figura 21 – Clivagem da ligação β -aryl éter de unidades não fenólicas (68, 72, 74, 80).

Uma pequena fracção da lenhina é degradada também pela clivagem das ligações carbono-carbono, contribuindo também na redução do tamanho das cadeias laterais de propano ou na sua completa eliminação (Figura 22) (60, 62, 72).

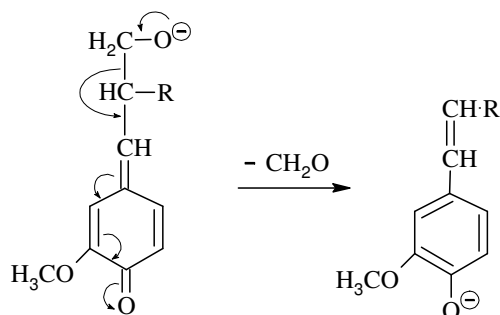


Figura 22 – Clivagem da ligação carbono-carbono.

A dissolução da lenhina dá-se em três fases, definindo desta forma as fases do cozimento. A primeira fase (fase inicial) é controlada por difusão e ocorre a temperaturas inferiores a 140°C. Nesta primeira fase 20-25% da quantidade total da lenhina da madeira é dissolvida e quebram-se as ligações α - e β -aril éter das unidades fenólicas. Destas quebras resultam novas unidades capazes de sofrer o mesmo tipo de reacções (68, 80, 84, 90).

A segunda fase (fase principal) é controlada cineticamente pela velocidade das reacções e ocorre a temperaturas superiores a 140°C. Esta fase inicia-se ainda na fase de aquecimento do reactor e apanha parte da fase de cozimento da madeira a 160-170°C. A dissolução nesta fase é altamente beneficiada com o aumento da temperatura e mantém-se elevada até se atingir uma dissolução de 90%, o equivalente a um índice kappa de 35-40. Nesta fase a quebra das ligações α - e β -aril éter das unidades fenólicas progride muito mais rapidamente e já se observa a quebra das ligações β -aril éter das unidades não fenólicas (68, 76, 84, 88, 91, 92).

A terceira fase (fase residual) envolve velocidades de dissolução baixas e pode ser regulada parcialmente alterando a carga alcalina. Esta fase alberga a fase final do cozimento a 160-170°C. Nesta última fase a lenhina pode sofrer reacções de condensação, através da formação de ligações carbono-carbono (Figura 23) (80).

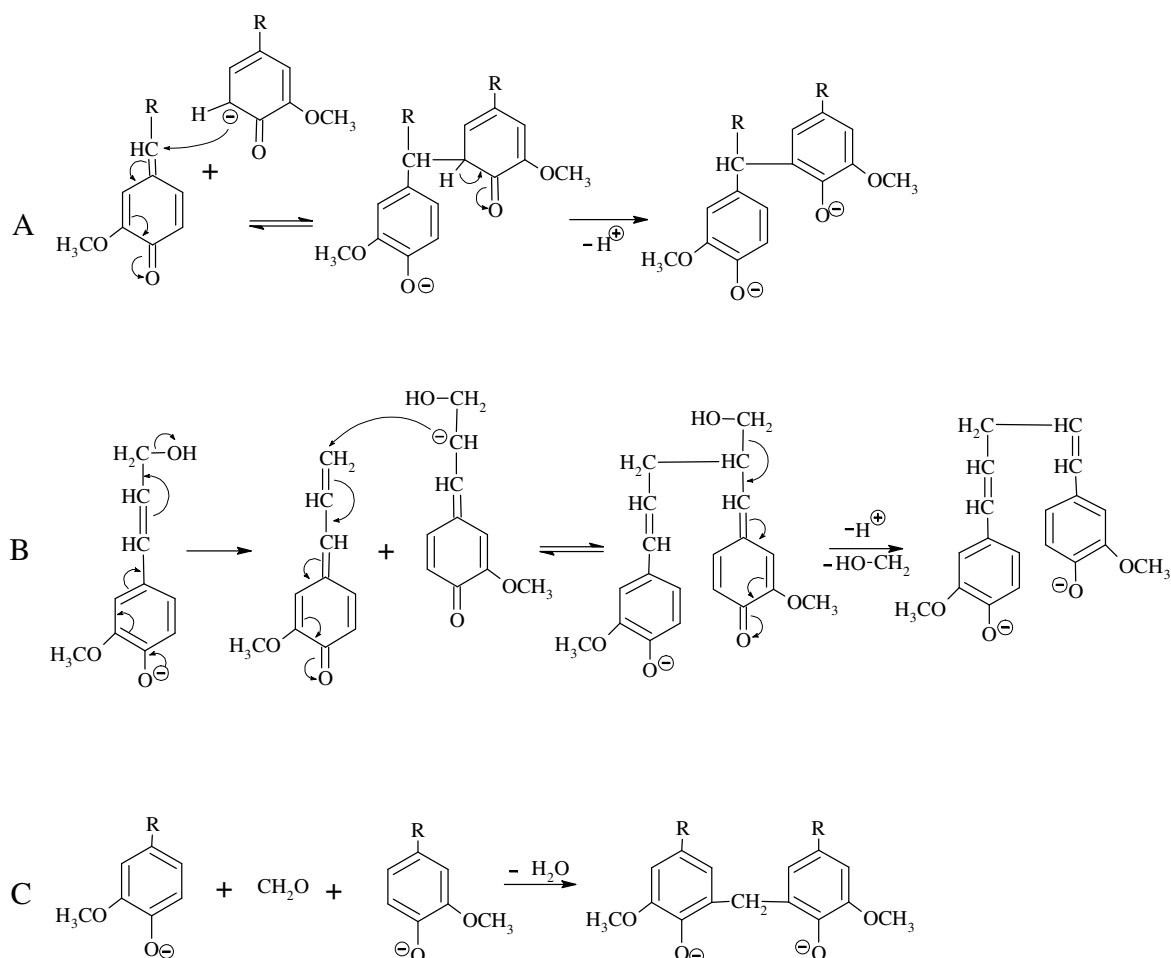


Figura 23 – Reacções de condensação da lenhina em meio alcalino. A – Condensação primária, B- Condensação secundária, C- condensação com formaldeído (74).

A formação destas ligações dificulta a dissolução da lenhina nesta última fase, devido à formação de moléculas de maior peso molecular. Estas novas moléculas podem precipitar na pasta no fim do cozimento. Esta lenhina que permanece na pasta denomina-se como lenhina residual (68, 72, 88, 91-95).

As folhosas, com maior número de unidades siringilo, e especialmente o *E. globulus* que tem uma lenhina tipo S, sofrem um menor número de reacções de condensação, pois estas unidades não podem entrar neste tipo de reacções pelo C5 (60, 74).

2.2.1.2 Reacções dos polissacarídeos

2.2.1.2.1 Comportamento geral dos polissacarídeos

A celulose e as hemiceluloses são os constituintes principais da pasta. Durante o cozimento os polissacarídeos são atacados, atingindo graus de polimerização que variam entre 2000 e 4000 para a celulose e 50 e 100 para as hemiceluloses (15).

A reactividade dos polissacarídeos depende essencialmente da sua estrutura e da acessibilidade que o licor de cozimento tem ao interior das aparas. A celulose, devido ao maior grau de cristalinidade, à pouca reactividade e à sua maior insolubilidade, é bastante mais resistente que as hemiceluloses. Durante o cozimento a cristalinidade da celulose chega a aumentar, resultado, essencialmente, da remoção das zonas amorfas e reorganização da sua estrutura (96-98).

Os hidratos de carbono são atacados no início do processo, a uma temperatura relativamente baixa, o que significa que grande parte dos grupos acetilo das hemiceluloses é removida muito cedo, assim como a remoção dos grupos terminais (peeling primário). A quebra das ligações dos grupos acetilo em meio alcalino forma os acetatos que se encontram no fim do processo kraft. No início do cozimento, enquanto apenas 5% da lenhina é removida, as perdas em material não lenhoso é de cerca de 15% (sendo a maioria hidratos de carbono). No total do cozimento kraft perdem-se cerca de 30% dos polissacarídeos da madeira, significando que 30-70% das hemiceluloses e aproximadamente 10% da celulose da madeira são degradadas e dissolvidas durante este processo (15, 80, 99).

Durante o cozimento kraft quantidades consideráveis de hemiceluloses são perdidas para o licor de cozimento, das quais uma grande parte é apenas dissolvida. A quantidade de xilanas dissolvidas atinge um máximo a meio do processo de deslenhificação (80). Das hemiceluloses que se perdem para o licor, uma quantidade apreciável de xilanas pode ser recuperada, enquanto que as glucomananas que são degradadas em maior extensão não podem ser recuperadas. Na realidade, as hexosanas (ex. glucomananas e glucanas) que se dissolvem da madeira para o licor de cozimento são destruídas rapidamente, enquanto que as pentosanas são mais resistentes e como tal constituem a fracção maioritária de hidratos de carbono do licor (ver mais à frente) (100, 101).

2.2.1.2.2 Reacções de peeling e stopping

A degradação dos hidratos de carbono deve-se essencialmente à reacção de “peeling” que resulta na quebra das ligações glicosídicas dos grupos terminais redutores e rearranjo dos iões enolatos com a eliminação dos açúcares adjacentes (Figura 24).

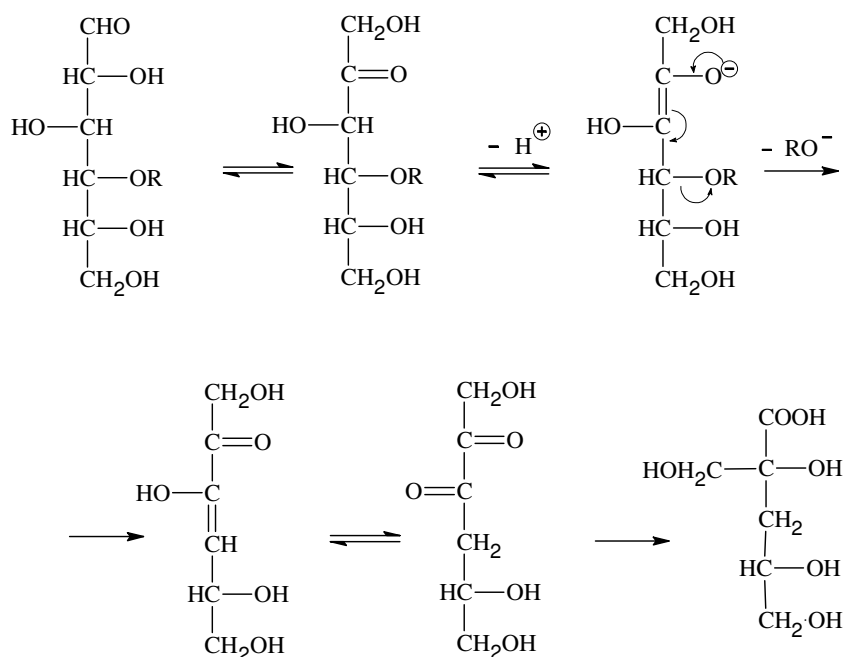


Figura 24 – Reacção de peeling.

Como resultado desta reacção há a libertação de hidratos de carbono que se convertem em ácidos hidroxílicos. No decorrer do cozimento há também a formação dos ácidos acético e fórmico, assim como alguns ácidos dicarboxílicos. É de notar que da carga alcalina activa inicial apenas 20-30% é usada na degradação dos produtos da lenhina, os restantes 60-70% é usada na neutralização dos ácidos hidroxílicos que se formam por cada monómero libertado por *peeling* (ácido isossacarínico) e ~10% é consumido na neutralização dos ácidos urónico, acético e fórmico (74, 80, 102).

A reacção de peeling não necessita de condições muito drásticas para ocorrer, esta começa com temperaturas aproximadas de 100°C e, como tal, os hidratos de carbono começam logo na fase inicial do cozimento a sofrer a perda dos grupos terminais. A reacção é beneficiada com o aumento da concentração de OH⁻, embora a sua extensão seja

significativamente reduzida com o uso de concentrações de alcalis demasiado elevadas (67). No início do cozimento esta é a forma predominante da degradação dos polissacarídeos (68, 74, 80, 99, 103).

A reacção de peeling, depois da eliminação de algumas unidades terminais, é interrompida por uma reacção que converte o terminal redutor num ácido carboxílico, não permitindo que o peeling prossiga. Esta reacção é denominada por reacção de stopping (Figura 25). No caso da celulose, é esperado que esta perca estatisticamente 50-60 unidades terminais até que a reacção de stopping ocorra (67, 74, 104).

O processo de degradação, que envolve a competição de duas reacções (reacção de peeling e de stopping) é bastante afectado pela estrutura física, pelo tipo de polissacarídeo, pela concentração de alcali activo e pela temperatura de reacção (67).

A celulose, devido à sua maior cristalinidade, resiste melhor à reacção de peeling, resultado da maior dificuldade de acessibilidade do alcali às cadeias. Quando a reacção de peeling atinge um terminal passível de se degradar, mas este se encontra numa região cristalina, inacessível ao alcali, a reacção de peeling termina, impossibilitando a progressão da reacção (32, 67, 74). As hemiceluloses e a celulose amorfa, pelo contrário, reagem mais facilmente com o alcali (estão bastante mais acessíveis), resultando em reacções de peeling mais extensas.

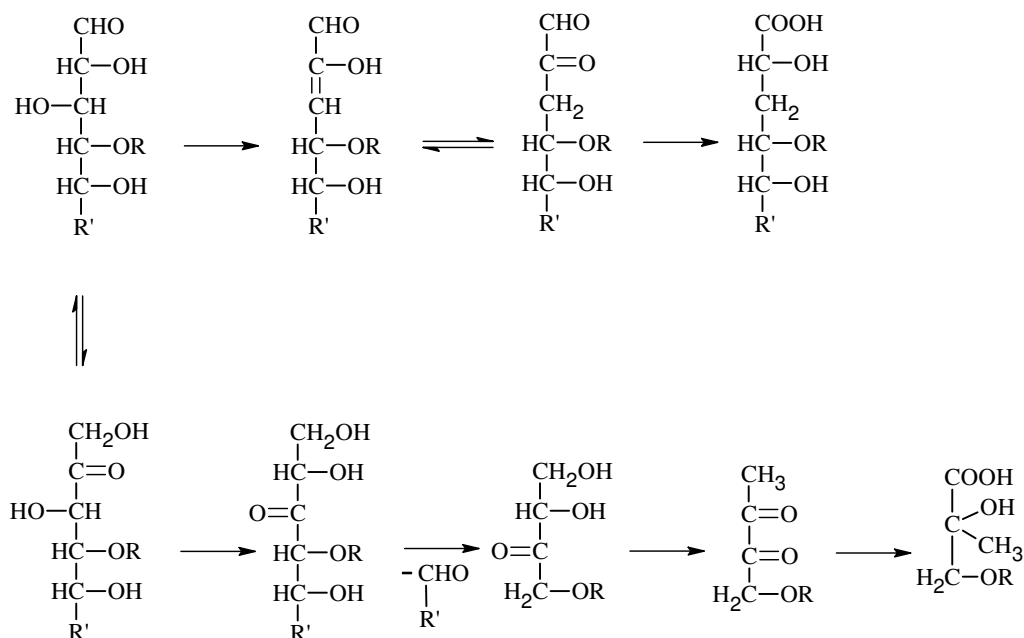


Figura 25 – Reacção de Stopping (74).

A composição do polissacarídeo também afecta a velocidade de reacção do peeling. A reactividade da xilobiose é superior à da celobiose, no entanto, a presença de grupos terminais ácidos estáveis, que é bastante elevada nas xilanas e inexistente na celulose, dificultam as reacções de peeling. No entanto, a estabilização dada por estes grupos diminui com o aumento da temperatura. Sabe-se que as xilanas são mais estáveis ao peeling alcalino que outras hemiceluloses. Alguns investigadores atribuem ao MeGlcA (que está ligado ao C2 das unidades de xilopirranose) essa estabilização. Contudo, este ácido é bastante sensível à degradação alcalina, mesmo a 100°C, não podendo ser responsável pela maior estabilidade que se encontra a temperaturas mais elevadas. Depois da unidade terminal de xilose ser rapidamente eliminada por peeling, o ácido galacturónico, que se encontra no final das cadeias das xilanas (Figura 12), estabiliza-as momentaneamente e atrasa as reacções de peeling. Esta estabilidade, no entanto, não é permanente, pois ocorre a eliminação do grupo hidroxilo do carbono 3 e forma-se um ácido 2-enurónico que se decompõe a temperaturas superiores a 100°C. A unidade terminal de ramnose resultante é eliminada muito rapidamente, não atrasando a progressão da reacção de peeling (Figura 24) (67, 80, 105).

As estrutura das hemiceluloses do *Eucalyptus globulus* é mais resistente à reacção de “peeling” que as hemiceluloses da maioria das folhosas, pois em algumas xilopirranoses a posição 2 está ocupada por grupos substituintes estáveis que atrasam a reacção de “peeling” (Figura 24).

2.2.1.2.3 Reacção de hidrólise alcalina

A degradação dos polissacarídeos não se dá apenas por reacções de “peeling”. A hidrólise alcalina das ligações glicosídicas é outra forma de se perder os polissacarídeos da pasta para o licor. A hidrólise ocorre de uma forma totalmente aleatória e quebra os polissacarídeos a meio. Desta forma o grau de polimerização dos polissacarídeos diminui, tornando-os mais solúveis, dissolvendo-se mais facilmente no licor. Esta reacção requer condições um pouco mais drásticas, uma temperatura mínima de 140°C-150°C, que se encontra na fase principal do cozimento. A hidrólise alcalina envolve a ionização do

hidroxilo do C2, a eliminação do grupo alcoxi por β -eliminação e formação de epóxido (Figura 26) (33, 68, 74, 80, 99, 103, 106).

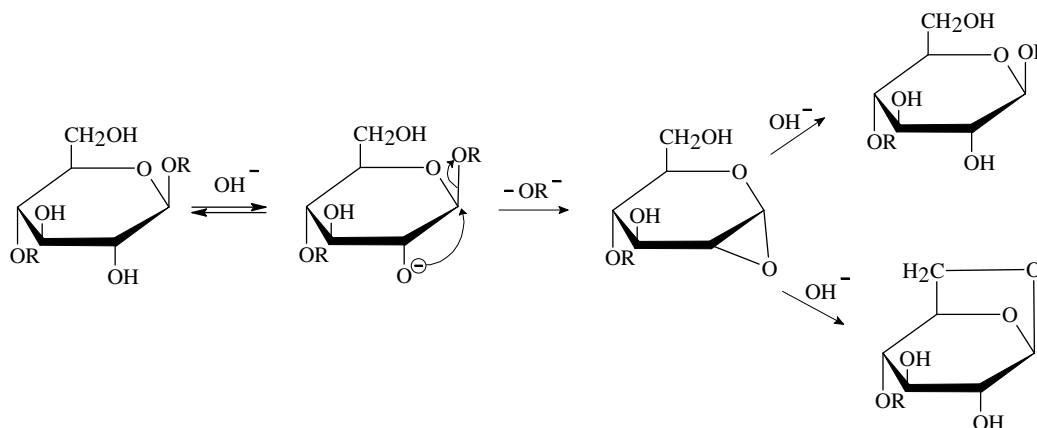


Figura 26 – Hidrólise das ligações glicosídicas em meio alcalino (74).

A hidrólise é bastante dependente da concentração de alcali e da temperatura. A velocidade de reacção de hidrólise aumenta com a concentração do ião hidroxilo até um valor máximo, a partir do qual a velocidade da reacção se mantém constante (67). A dependência com a temperatura vem explicada pelo valor da energia de activação que é cerca de 36-38 kcal/mol, um valor relativamente elevado, que resulta em reacções mais extensas para temperaturas mais elevadas (67).

Como resultado da hidrólise alcalina das ligações glicosídicas, que ocorre a altas temperaturas, formam-se novos grupos terminais susceptíveis de reacção de peeling – Peeling secundário. No cozimento, a hidrólise associada à reacção de peeling secundário é uma das principais causas para a diminuição do rendimento e da força das fibras (67).

2.2.1.2.4 Formação de ácido hexenurónico (HexA)

Durante o cozimento kraft o MeGlcA sofre uma desmetoxidação pela β -eliminação do grupo metoxilo formando o ác. 4-deoxi- β -L-threo-hex-4-enopiranosilurónico (HexA). Esta conversão do MeGlcA em HexA durante o cozimento kraft foi, primeiramente demonstrada por Johansson e Samuelson (107) (Figura 27).

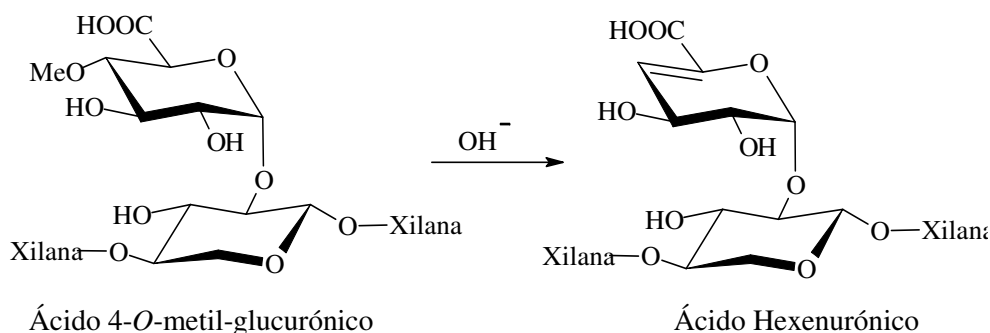


Figura 27 – Reacção de formação do ácido hexenurónico (108).

O HexA que se forma durante o cozimento kraft é um dos ácidos urónicos principais constituintes das pastas kraft e das fracções de xilanas que se encontram dissolvidas nos licores de cozimento. A quantidade de HexA na pasta é fortemente influenciada pelas condições de cozimento (109-111). Os grupos enol éter e ácidos carboxílicos insaturados influenciam muito a estabilidade e a reactividade do HexA que é praticamente inerte em condições suaves. Em soluções com alcalinidades muito fortes e a altas temperaturas o HexA decompõe-se lentamente. Contudo os grupos substituintes do HexA sofrem facilmente ataques nucleófilos e electrófilos.

Os valores de pKa de dissociação das ligações α e $\beta(1 \rightarrow 2)$ do MeGlcA e do HexA ligados à xilana são de 3,13 e 3,03, respectivamente (105, 112). A velocidade das reacções de degradação do MeGlcA e do HexA depende fortemente da temperatura de cozimento, da concentração de alcali efectivo, do pH do meio e da força iónica. A velocidade de dissolução/degradação do HexA aumenta com a concentração do ião hidroxilo, assim como com o aumento da concentração do ião HS^- e com o aumento da temperatura. A influência da força iónica não é tão significativa mas apresenta a mesma tendência (113, 114). Durante o cozimento quase todo MeGlcA se converte em HexA, o restante é degradado. No início do cozimento kraft, esta conversão é muito rápida e em grande extensão. Ao fim de 90 minutos de reacção observa-se um abrandamento (Figura 28) (109, 110, 112).

Apesar da degradação parcial verificada ao longo do cozimento, o HexA é o ácido mais abundante existente na xilana da pasta, mesmo na fase final do cozimento. O MeGlcA degrada-se muito rapidamente com o avançar do tempo de cozimento. No entanto, consegue-se encontrar uma pequena quantidade de MeGlcA na pasta, revelando que parte destes grupos iniciais não reagiu com os reagentes de cozimento (Figura 28) (109, 110).

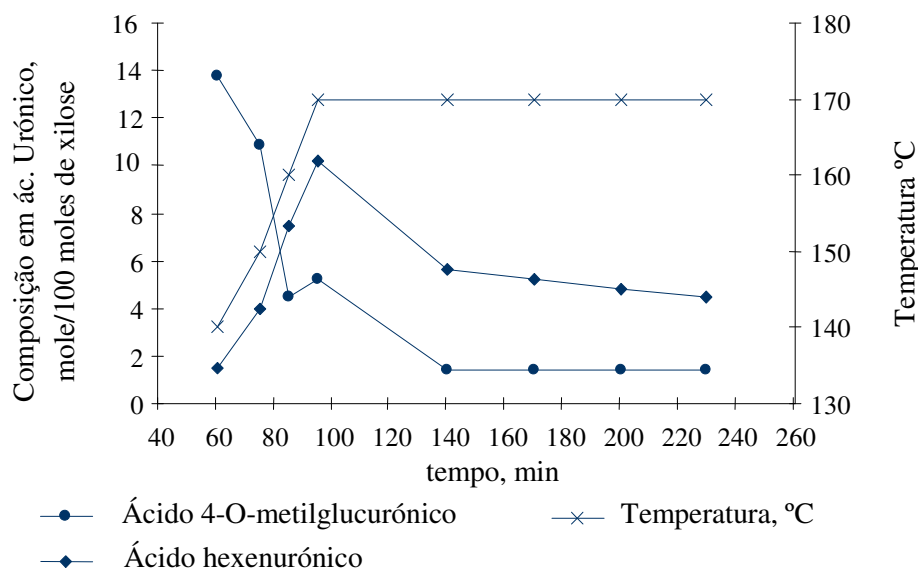


Figura 28 – Comportamento do HexA e do MeGlcA durante o cozimento kraft. O perfil de temperaturas é indicado (105, 109).

Alguns autores chegam a sugerir que a conversão do MeGlcA em HexA é a principal responsável pela maior estabilidade das xilanas, visto o HexA apresentar uma relativa estabilidade a temperaturas inferiores a 170°C e estando este ligado ao C2 das unidades de xilopirranose, obriga a um abrandamento das reacções de peeling (67, 80, 105) (Figura 24).

As xilanas residuais têm uma quantidade de grupos ácidos (MeGlcA e HexA) muito inferior em relação à que existe nas xilanas nativas. Nas xilanas de pasta e nas dissolvidas no licor a proporção de ácido urônico-xilose é cerca de 1:25 enquanto que nas xilanas da madeira é de 1:10 nas folhosas e 1:5 nas resinosas. As xilanas das pastas são também mais pobres em MeGlcA que as xilanas que se encontram no licor de cozimento. Uma vez que as xilanas não estão igualmente substituídas por grupos ácidos urónicos, as xilanas mais ricas nestes grupos são dissolvidas preferencialmente, deixando as menos substituídas na pasta (114). A estabilidade e degradação do MeGlcA são diferentes quando se fala das xilanas da pasta ou das xilanas dissolvidas no licor. Enquanto que estes grupos são mais atacados e sofrem maior influência da temperatura nas xilanas dissolvidas no licor, os grupos MeGlcA das xilanas das pastas são mais preservados e não apresentam um grande grau de degradação. Um comportamento análogo é observado quando se fala nos grupos HexA das xilanas, havendo um ligeiro aumento na dependência da temperatura

para os grupos ligados às xilanas da pasta. Assim, cozimentos realizados com temperaturas mais elevadas resultam em xilanas dissolvidas menos ricas em grupos acídicos enquanto que nos cozimentos realizados a temperaturas menores as xilanas dissolvidas no licor apresentam um grau de substituição em ácidos urónicos mais elevados (115).

Assim, a variação das quantidades do MeGlcA e HexA nas pastas durante o processo kraft é resultado de 4 processos: o consumo do MeGlcA e consequente formação do HexA, a dissolução e posterior deposição das xilanas na pasta, a degradação das xilanas pelas reacções de peeling e hidrólise e da simples clivagem das ligações glicosídicas existentes entre a xilana e o MeGlcA e HexA.

2.2.2 Dissolução/retenção das hemiceluloses no licor durante o cozimento

No processo kraft ainda temos outros fenómenos bastante importantes que ocorrem durante o cozimento – A precipitação e a absorção e/ou adsorção dos hidratos de carbono. Os hidratos de carbono, provenientes da celulose e principalmente das hemiceluloses dissolvidas no licor, podem precipitar na superfície da pasta (80, 103, 116). Conhecer o que acontece às hemiceluloses durante o cozimento sempre foi importante do ponto de vista industrial pois uma maior retenção destas traz, além de um maior rendimento, propriedades à pasta que podem ser benéficas.

As hemiceluloses são muito susceptíveis a alterações físicas e químicas em meio alcalino. Estas alterações podem provocar o intumescimento, a dissolução, a precipitação, e as já mencionadas reacções de peeling e de hidrólise. Entre os anos 60 e 80 diversos investigadores estudaram o perfil de dissolução das hemiceluloses ao longo do cozimento, especialmente de hemiceluloses de resinosas. Uma maior carga alcalina resulta numa diminuição de rendimento do cozimento, resultante da menor quantidade de hemiceluloses retidas na pasta (arabinoglucuronoxilanas e galactoglucomananas) (106, 117-119).

Dependendo do tipo de hemicelulose é possível observar diferentes comportamentos ao longo do cozimento. Durante a fase inicial do cozimento, a temperaturas inferiores a 130°C, as glucomananas das folhosas dissolvem-se rapidamente, observando-se grandes perdas destes polímeros da madeira para o licor. As glucuronoxilanas, pelo contrário, são mais estáveis nesta gama de temperaturas, não havendo perdas significativas. No entanto

para temperaturas mais elevadas, na fase principal com temperaturas superiores a 140°C, o teor das glucomananas mantém-se aproximadamente constante e as glucuronoxilanas começam a apresentar uma maior degradação e dissolução. Maiores alcalis favorecem também este comportamento (48, 80, 99, 106, 114, 117). Durante fase inicial do cozimento perde-se grande parte das hemiceluloses da madeira para o licor (40% das hemiceluloses da madeira), mais especificamente, 40% das glucuronoxilanas iniciais e 70% de glucomananas iniciais (38, 39, 90, 109, 114, 116, 119). Kondo e Sarkanen (90) chegaram a estimar um valor de 7% para a madeira que se dissolve directamente no licor de cozimento durante o primeiro estágio do cozimento. Nesta fase do cozimento as hemiceluloses que se dissolvem directamente no licor apresentam pesos moleculares menores (Mw 5000-9000) (120, 121). As restantes hemiceluloses se perdem resultam das reacções de peeling. Como consequência da reacção de peeling a acessibilidade a mais hemiceluloses para o ataque químico fica facilitada. Nesta fase não se observa uma contribuição significativa da hidrólise alcalina das ligações glicosídicas para esta perda inicial (67, 99, 90).

Foi registado por alguns autores a presença de amido (α -glucana) no licor de madeira de resinosas na fase inicial do cozimento. O amido apresenta alguma resistência à degradação alcalina aparecendo no licor de cozimento nesta fase, mas é gradualmente destruído nas fases de cozimento mais tardias (38, 116).

Depois da dissolução na fase inicial, e já na fase principal do cozimento, a concentração de xilana dissolvida no licor atinge um máximo, depois de aproximadamente 1-1,5 hora à temperatura de cozimento (Figura 29) (7, 67, 122). Estas hemiceluloses, que se perdem na fase principal por dissolução no licor, apresentam maiores pesos moleculares que as que se dissolvem na fase inicial (Mw 13000-29000), devido principalmente às maiores temperaturas utilizadas (121).

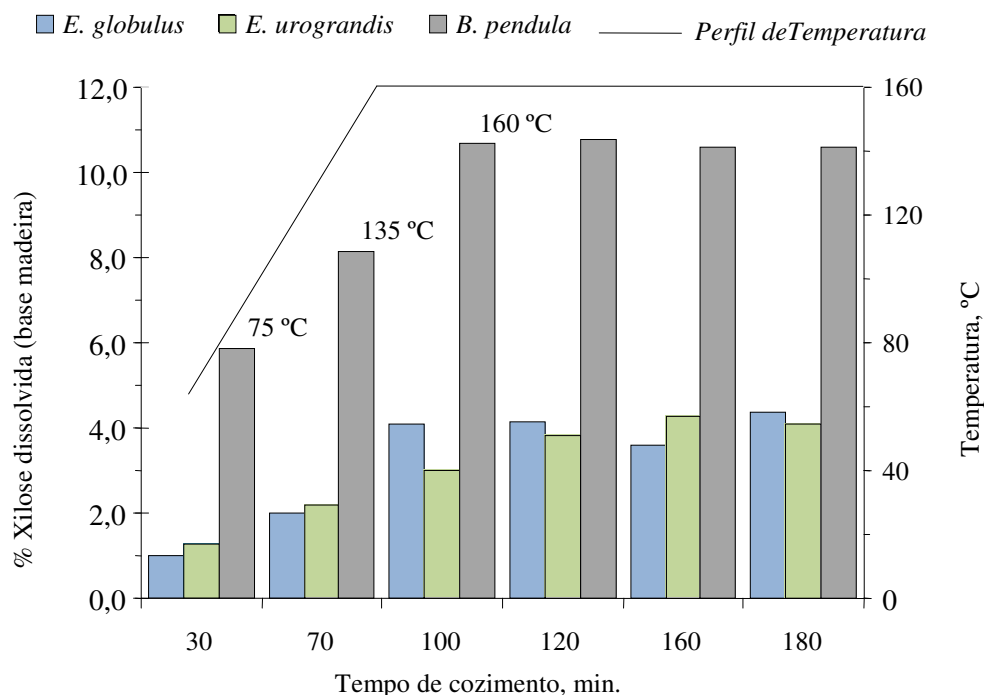


Figura 29 – Percentagem de xilose dissolvida (como monossacarídeo anidro) durante o cozimento kraft de três espécies de folhosas, sob condições de cozimento idênticas (7).

No meio da fase principal do cozimento verifica-se uma diminuição na velocidade de degradação e dissolução das xilanas. Este facto deve-se essencialmente à diminuição da alcalinidade do meio e à diminuição da solubilidade das xilanas como resultado da perda de grupos ácidos urónicos, que favorecem a dissolução (Figura 29) (7, 114, 117, 123).

2.2.2.1 Precipitação das xilanas

As hemiceluloses dissolvidas podem ser recuperadas do licor por meio de precipitação, este facto reforça a ideia de estas se dissolverem no licor sem que haja uma degradação muito acentuada.

Durante a fase final do cozimento observa-se a diminuição de concentração de xilanas no licor de cozimento e um ligeiro aumento destas na pasta, diminuindo assim a quantidade de hemiceluloses recuperadas. Este facto resulta da maior degradação das xilanas e/ou da sua adsorção nas fibras (122). No final do cozimento a superfície da pasta fica mais rica em xilose com uma razão molar entre glucose e xilose menor ou igual a 1

(74). A camada superficial das fibras da pasta kraft têm uma composição em xilanas superior do que a camada interna, e o grau de substituição em ácidos urónicos das xilanas da superfície é menor que o das xilanas das camadas mais internas das fibras. Este facto pode resultar tanto da migração das xilanas do interior das fibras para o exterior assim como da precipitação das xilanas, anteriormente dissolvidas no licor de cozimento, na superfície das fibras. A adsorção das xilanas ocorre primeiramente na superfície das fibras mas também nas camadas internas das fibras (embora em muito menor extensão) (74, 123-128). Além das xilanas, encontra-se também uma pequena quantidade de glucomanana, resultado da sua precipitação sobre as fibras, embora esta seja em muito menor extensão (129).

Como resultado das mudanças na composição química das fibras, do abaixamento da alcalinidade do licor no final do cozimento e das mudanças estruturais nas xilanas, principalmente a sua menor substituição, existe um aumento de xilanas na superfície das fibras proveniente da adsorção parcial das xilanas dissolvidas no licor. Os padrões de substituição e o grau de substituição das xilanas são os factores que mais influenciam a sua solubilidade na solução (99, 109, 114, 116, 122, 123, 128, 130-132).

A saponificação alcalina dos grupos acetilo e ésteres urónicos nas xilanas contribuem também para a sua deposição sobre as fibras como resultado da sua cristalização parcial e agregação. A remoção dos grupos ácidos da cadeia da xilana resulta numa diminuição da densidade de carga. Desta forma existe uma diminuição da repulsão electrostática e numa menor solubilidade e, conseqüentemente, numa maior aptidão à agregação das xilanas devido à maior facilidade de estas interagirem e de se associarem (25, 67, 130, 133-135). Como resultado do que se referiu anteriormente, as xilanas adsorvem sobre a superfície sob a forma de agregados. Além disso, depois da remoção dos grupos substituintes das xilanas, a afinidade entre estas e a celulose aumenta. As xilanas passam a apresentar uma estereoquímica mais favorável à formação de pontes de hidrogénio com a celulose (25, 98, 131, 133, 134, 136), ordenando-se de forma a estabelecer estas ligações, e o mais provável é adoptarem uma conformação de cadeia idêntica à da celulose (98, 130, 133). Têm sido feitos vários estudos sobre as ligações que se formam entre as xilanas precipitadas e a celulose, e estas conseguem formar ligações de hidrogénio bastante fortes com a superfície da pasta (103). As xilanas que adsorvem na superfície da fibras celulósicas modificam essa

superfície morfológicamente e quimicamente (135). A precipitação das xilanas é um processo aparentemente irreversível (101, 135).

O grau de precipitação das xilanas nas fibras depende de uma variedade de parâmetros. O substrato onde se está a efectuar os estudos de adsorção, assim como a concentração, a temperatura e o tempo de reacção são factores importantes (25, 101, 123, 134, 135). O pH pelo contrário tem pouca influência, especialmente para valores relativamente baixos, pH=6-10 (25, 134). As diferenças entre as várias xilanas também mostram ter importância nas quantidades sorvidas. Xilanas não solúveis formam aglomerados que adsorvem na pasta em maiores quantidades que as xilanas solúveis. Estas alteram a morfologia da superfície em maior extensão que as xilanas solúveis (101, 135).

A força iónica, embora exista alguma discordância entre autores, é também um factor que influencia a dissolução/retenção das xilanas nas fibras. Uma força iónica elevada, diminui a velocidade de dissolução/degradação das xilanas, aumenta a velocidade de degradação do ácido urónicos e consequentemente aumenta a retenção das xilanas. No entanto, não aparenta ter influência na dissolução/degradação de outras hemiceluloses como as glucomananas (114, 130). Sandstrom (137), afirma o contrário pois diz que uma baixa força iónica beneficia a retenção e a diminui a degradação das hemiceluloses.

É importante salientar que a quantidade de xilanas existentes na superfície da fibra ou de lenhina, que resulta da degradação final e posterior deposição, não impedem que a adsorção/precipitação de mais xilanas (79, 116, 123, 138, 139).

Neste capítulo foi visto que existem um número de considerações a serem feitas quando se pensa em precipitar as xilanas na pasta. Na maioria dos trabalhos realizados a precipitação foi comprovada em sistemas modelos, e não durante um cozimento kraft, onde se observa um abaixamento do pH no fase residual e onde a concentração da xilana no licor negro é constante. Será interessante observar a precipitação de xilanas durante o cozimento kraft, especialmente da madeira de *E. globulus*. Aparentemente não existem estudos de precipitação de xilanas durante o cozimento kraft de *E. globulus*, que apresentando uma xilana relativamente estável às condições alcalinas, pode apresentar um comportamento diferente. Quais as melhores condições de cozimento em que a precipitação ocorre é importante industrialmente tendo como objectivo o melhoramento do processo kraft.

2.2.3 O Licor Negro

O licor negro, também conhecido como lixívia negra, resulta do licor de cozimento da madeira que se insere no início do processo de produção da pasta (Licor branco).

Diversos estudos foram feitos sobre a composição do licor negro (80, 140-142). A composição do licor negro, além de depender do tipo de madeira usada, depende também do processo utilizado: processo kraft (ou processo ao Sulfato), processo ao sulfito e processo à soda. O licor negro é uma substância bastante complexa e a sua composição é muito variada. Este contém uma grande percentagem de lenhina (toda a que foi removida das aparas da madeira), uma grande quantidade de hemiceluloses (que foram sendo dissolvidas e degradadas durante o cozimento), uma pequena quantidade de celulose e glucanas (resultante da sua dissolução no licor), ácidos sacarínicos (resultantes das reacções de degradação dos polissacarídeos), um conjunto de extractáveis (que foram sendo removidos por serem solúveis no licor de cozimento) e material inorgânico, que resulta essencialmente dos reagentes químicos activos do cozimento (NaOH e Na_2S) e outros compostos como carbonato de sódio, sulfato de sódio, tiosulfato de sódio e polissulfitos (87, 116, 142).

A lenhina é um dos componentes principais do licor negro. Nas folhosas a lenhina representa cerca de 32% em matéria seca no caso da Bétula e 42% para o Eucalipto e para as resinosas, como o pinho, cerca de 43%. No entanto, apresenta-se bastante fragmentada e alterada devido às reacções de degradação, resultando em compostos fenólicos de baixo peso molecular (140, 143). O licor negro contém também grandes quantidades de produtos de baixo peso molecular resultantes da degradação das hemiceluloses. Dos produtos de degradação das hemiceluloses contidos no licor resulta uma quantidade significativa de uma mistura de produtos como os ácidos sacarínico, acético e fórmico assim como outros ácidos hidroximonocarboxílicos e dicarboxílicos (aproximadamente 35% da matéria seca para a Bétula e 31% para o pinho) (Tabela 3) (99, 116, 121, 140, 143-146). Embora se encontre em alguma literatura apenas os ácidos principais, foram já identificados mais de 20 compostos resultantes da degradação dos hidratos de carbono durante o cozimento (99, 147).

Tabela 3 – Composição dos ácidos carboxílicos principais existentes no licor negro de uma folhosa (Bétula) (99, 143).

Composto	Composição relativa do licor negro, %
Monocarboxílicos:	~90
Ácido fórmico	12-15
Ácido acético	29-34
Ácido glicólico	3-4
Ácido láctico	6-11
Ácido 2-hidroxi-butanoico	11-16
Ácido xiloisossacarínico	9-11
Ácido glucoisossacarínico	7-9
Dicarboxílicos	~5

Na composição do licor negro encontra-se ainda uma pequena quantidade de polissacarídeos, resultantes da degradação e consequente diminuição do peso molecular médio das hemiceluloses, que foram removidos da madeira para o licor por dissolução destas. Estes polissacarídeos constituem cerca de 2-5% da matéria seca do licor negro, dos quais cerca de 35% são compostos por xilose e cerca de 41% compostos por galactose (140, 143).

Das hemiceluloses do licor negro é possível encontrar xilanas passíveis de precipitar e que apresentam características estruturais interessantes, no sentido de se apresentarem pouco degradadas, com pesos moleculares médios relativamente elevados (148). Estas xilanas, podendo precipitar sobre a pasta kraft, trariam benefícios para as indústrias da pasta e do papel.

2.2.4 Variáveis do processo kraft

Como foi dito anteriormente uma das características do processo kraft é a alta qualidade da pasta obtida, principalmente em relação ao baixo teor de lenhina residual, à menor degradação dos hidratos de carbono (celulose e hemiceluloses) e boas propriedades físico-mecânicas.

De entre todas as variáveis e parâmetros do cozimento que influenciam a pasta e a sua qualidade, a temperatura de cozimento e o alcali activo (AA) são das mais importantes, pois afectam directamente a quantidade de lenhina removida. Existem também as variáveis associadas à matéria-prima que são importantes pois condicionam de forma significativa as condições do cozimento.

As variáveis associadas à madeira (a espécie, a idade, a humidade, a densidade e a granulometria) são variáveis não controladas, a qualidade da pasta final depende de uma optimização do processo para cada tipo de madeira. No entanto, existem também parâmetros controláveis de origem processual a ter em conta (razão líquido/madeira, carga alcalina, índice de sulfuretos, tempo e temperatura). A dimensão das aparas é também uma variável a ter em conta no processo.

É essencial ter um controlo do grau de deslenhificação que se obtém no fim do cozimento. Este grau de deslenhificação é medido pela quantidade de lenhina residual na pasta através de testes laboratoriais – O Índice Kappa (IK). Este parâmetro é um dos primeiros a ser definido, pois o cozimento é todo ele programado e optimizado para um determinado grau de deslenhificação. Para a madeira de *Eucalyptus globulus* o IK pretendido varia geralmente entre 14 e 17. Depois do IK final pretendido estar definido, o cozimento é planeado de forma a qualidade da pasta e o rendimento total em pasta sejam maximizados (149). Quando se determina o IK, é necessário ter em conta que os grupos HexA contribuem para aumentar o valor deste parâmetro e como tal aparece como uma “falsa lenhina”.

Uma das primeiras variáveis a ter em conta é a razão licor/madeira ou hidromódulo. Esta variável depende essencialmente das dimensões do digestor e do grau de empacotamento das aparas no seu interior. É necessário garantir a impregnação completa das aparas e que existe licor suficiente para que haja uma circulação de licor uniforme em todo o digestor. Quando se calcula a razão líquido/madeira e a quantidade de licor a introduzir ao digestor deverá ter-se em conta a humidade das aparas que entram no digestor e a quantidade de água que ficou retida durante a impregnação. Na indústria é normal encontrar hidromódulos com valores entre 3,5 e 4 litros por kg de madeira seca (39).

A temperatura e o tempo de cozimento são variáveis que andam a par quando se define as condições do cozimento. Como seria de esperar, a escolha da temperatura e do

tempo de cozimento dependem grandemente do tipo de madeira que se está a processar e das concentrações de reagentes usadas.

A reacção de deslenhificação só ocorre a temperaturas superiores a 140°C, definindo-se desta forma a temperatura mínima a ser utilizada. As temperaturas demasiado elevadas (>180°C) têm que ser compensadas com espessuras de aparas mais pequenas e mesmo assim obtém-se uma degradação excessiva do material celulósico. Além disso temperaturas mais elevadas resultam também em teores de pentosanas menores, valores de IK mais baixos e viscosidades intrínsecas menores. Para que não haja necessidade de se usar tempos de cozimento demasiado longos e/ou cargas alcalinas demasiado elevadas, é aconselhável usar temperaturas superiores a 155°C (39, 111, 150).

A carga alcalina, definida através do alcali activo (AA) e do alcali efectivo (AE), pode influenciar bastante o cozimento, especialmente a qualidade da pasta obtida no final. Esta variável é uma das mais importantes quando se fala de um cozimento kraft. A deslenhificação depende de forma significativa desta variável. A deslenhificação pretendida no final do cozimento é o factor que mais condiciona a carga alcalina usada no cozimento. Como foi visto anteriormente a carga alcalina é a quantidade de alcali por unidade de madeira e o valor da carga alcalina no digestor depende, além da deslenhificação pretendida no final, do tipo de madeira, das dimensões das aparas e das outras variáveis do cozimento (índice de sulfuretos, temperatura e tempo de cozimento).

É necessário ter em conta ainda que o licor de cozimento tem de ter uma alcalinidade suficiente para entrar no seio das fibras e separá-las e garantir uma alcalinidade residual elevada no fim do cozimento, pH >12. Assim, para as folhosas o AA mínimo é da ordem dos 13-14% como Na₂O. Para a espécie específica do eucalipto o AA normalmente usado varia entre 14 e 21%.

A utilização de cargas alcalinas baixas resulta em baixos rendimentos de pasta crivada e teores de incozidos demasiado elevados, mesmo quando se utiliza tempos de cozimento maiores. Pelo contrário, o uso cargas alcalinas demasiado elevadas, permite obter teores de deslenhificação bastante superiores, diminuição do teor de incozidos e uma maior brancura da pasta, para o mesmo tempo de cozimento. No entanto, AA elevados diminuem a selectividade da deslenhificação. Mesmo quando se diminui os tempos de cozimento e a temperatura, de forma a se obter o mesmo IK na pasta final, observa-se uma degradação dos polissacarídeos mais acentuada que um cozimento com menor AA,

nomeadamente pela diminuição do teor de xilanas, resultando na diminuição da qualidade da pasta e rendimentos mais baixos. Assim a carga alcalina a se usar no cozimento tem de ser optimizado para se obter o melhor resultado possível (39, 91, 102, 111, 114, 119, 150-152). O perfil de alcalinidade do cozimento tem ainda um efeito bastante significativo na quantidade de grupos carboxílicos da pasta. Estes grupos substituintes da xilana são removidos cerca de 50-65% com o uso de cargas alcalinas mais elevadas (109).

O índice de sulfureto (IS) é outra variável bastante importante no cozimento. A quantidade de ião reactivo HS^- é irrelevante quando se fala das reacções de degradação e de dissolução dos polissacarídeos. No entanto, é de extrema importância quando se fala das reacções que envolvem a lenhina, uma vez que o seu principal papel é aumentar a reactividade da lenhina tornando-a mais solúvel e menos condensada (39, 91). O HS^- ao acelerar a deslenhificação possibilita a utilização condições de cozimento mais suaves, permitindo obter pastas finais com menor grau de degradação dos polissacarídeos. Assim, uso de sulfureto de sódio aumenta a selectividade do cozimento, conseguindo-se rendimentos de pasta superiores e pastas com viscosidade e resistência maiores (91, 94, 114, 119, 150, 153-156).

A utilização de condições muito drásticas em relação à temperatura e à carga alcalina faz com que o efeito da sulfidez do licor não seja significativo, não se conseguindo tirar grandes vantagens da utilização do sulfureto. A carga alcalina e a temperatura a usar deverão ser as mínimas necessárias para se obter um cozimento eficiente e garantir os pressupostos mencionados anteriormente, para que o efeito da carga de sulfuretos seja maximizado.

É importante controlar a qualidade da pasta, pois vai condicionar uma série de variáveis processuais. A grandeza física que nos dá uma ideia da degradação/qualidade da pasta para um mesmo valor de IK é a viscosidade. Maiores valores de viscosidade resultam de pastas com maior qualidade e, consequentemente, de cozimentos mais selectivos. Esta grandeza indica que as cadeias poliméricas de celulose e de hemiceluloses foram menos degradadas. Para a madeira de *Eucalyptus globulus* o valor da viscosidade de referência é de 1200-1400 dm^3/kg (149).

2.3 IMPORTÂNCIA DAS HEMICELULOSES NA PRODUÇÃO DA PASTA E DO PAPEL

As hemiceluloses têm uma importância significativa no processo de fabricação da pasta e do papel, assim como nas características da pasta. Na realidade tem havido um crescente interesse na química das hemiceluloses, especialmente na das xilanas, na caracterização e na sua influência nas propriedades papelarias das pastas. Tem-se sugerido que, as diferenças encontradas, tanto a nível de processo de produção, como a nível de pastas resultantes de madeiras de diferentes espécies, advém das xilanas e da razão celulose/xilana (157-159).

As hemiceluloses afectam tanto as propriedades mecânicas da pasta como a sua refinação. De entre todas as hemiceluloses existentes na madeira, as xilanas são as que apresentam maior efeito nas propriedades nas fibras de holocelulose, especialmente as que se encontram na superfície destas (25, 124, 158-161).

Verificou-se que o intumescimento, assim como a flexibilidade e a conformidade das fibras, são melhorados com a presença das hemiceluloses ricas em ácidos urónicos, pois o seu carácter hidrofílico (resultante dos grupos hidroxilos e carboxilos) e o seu estado amorfo facilitam a sua ligação à água, aumentando a capacidade da fibra absorver água (intumescimento da fibra). Na refinação da pasta, as hemiceluloses têm um papel de destaque por esta mesma razão, facilitam a operação de refinação, diminuindo o tempo e a energia despendida para o efeito (39, 119, 158, 160).

As hemiceluloses favorecem também as ligações entre fibras. Estas aumentam a área de ligação e melhoram a distribuição das tensões internas, conferindo ao papel uma maior resistência ao rebentamento e à tracção. A resistência à drenagem, a densidade e o índice de tracção da pasta aumentam também com o maior do teor de hemiceluloses (124, 152, 158-160, 162).

As xilanas são também responsáveis pela carga das fibras quando estas estão suspensas em solução aquosa. A maior parte dos grupos carboxilos encontram-se ionizados, carregando as fibras de uma carga superficial negativa, permitindo a retenção dos aditivos catiónicos usados na fabricação do papel (160).

No entanto a adsorção das xilanas pode trazer também algumas desvantagens. As xilanas da superfície podem funcionar como uma barreira física à difusão da lenhina residual das fibras para o licor, dificultando a deslenhificação na fase final do cozimento

(25, 130). A sua presença na pasta traz também alguns problemas ao nível da reversibilidade da brancura das pastas branqueadas, devido aos grupos carboxilos. Estes ácidos contribuem para um maior consumo de químicos durante o branqueamento, diminuem a brancura, aumentam a reversão de brancura e dificultam a remoção de metais. Assim pastas com grandes quantidades de hemiceluloses ricas em ácidos urónicos têm maior probabilidade de amarelecerem com o tempo (105, 114, 163).

Tendo em conta as vantagens e desvantagens que o aumento de xilanas nas pastas traz à indústria de pasta e papelreira, é importante compreender o seu comportamento durante o cozimento kraft. Embora se tenha visto que existem algumas desvantagens na presença de xilanas na pasta, as vantagens que as xilanas oferecem à indústria papelreira são significativas e relevantes. Assim, a precipitação de xilanas na pasta final pode, além de aumentar o rendimento final do processo kraft, melhorar também as características da pasta.

Neste trabalho, o estudo efectuado sobre a precipitação das xilanas nas pastas no final do cozimento é, por tudo o que foi descrito, bastante importante, tentando dar algumas respostas às questões relacionadas com a precipitação de xilanas no final do cozimento.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 COZIMENTOS KRAFT

3.1.1 Madeira utilizada nos cozimentos

A madeira de *E. globulus*, já em forma de aparas industriais secas ao ar, foi fornecida pelo Instituto de Investigação Raiz, sendo a sua proveniência da fábrica da Portucel de Cacia, Aveiro.

As aparas foram crivadas laboratorialmente segundo a norma SCAN-CM 40:88, num classificador de cavacos STFI da Lorentzen & Wettre. Foi seleccionada a fracção com espessura menor de 8 mm, sendo esta a mais apropriada para os cozimentos laboratoriais.

Antes de cada cozimento foi feita uma selecção de aparas para que as dimensões fossem o mais uniforme possível e sem nós. As aparas foram secas ao ar e a sua humidade foi determinada para cada ensaio no início do cozimento. Em todos os ensaios foi utilizado 1Kg de madeira seca.

Foi determinada a composição química sumária da madeira (Tabela 4).

Tabela 4 - Composição em monossacarídeos da madeira, % m/m, madeira a.s.

Rham	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
0,1	0,4	14,7	1,1	1,8	53,4

3.1.2 Licor branco ou de cozimento

O licor de cozimento foi preparado com quantidades de NaOH, Na₂S e Na₂CO₃ previamente calculadas, tendo em conta a pureza dos reagentes, e confirmadas pelo teste descrito na norma SCAN-N2:88 (Teste ABC). Os reagentes foram cedidos pelo Raiz.

O teste ABC foi realizado num titulador automático, que permitiu obter as concentrações reais de NaOH, Na₂S e Na₂CO₃ no licor e corrigi-lo caso fosse necessário. A partir destas concentrações é possível calcular os parâmetros do licor negro: o alcali activo (AA), o alcali efectivo (AE), o Índice de sulfureto (IS) e a actividade (Act).

$$AA = [\text{NaOH}] + [\text{Na}_2\text{S}] \quad \text{Equação 3}$$

$$AE = [\text{NaOH}] + \frac{1}{2} [\text{Na}_2\text{S}] \quad \text{Equação 4}$$

$$IS = \frac{[\text{Na}_2\text{S}]}{[\text{NaOH}] + [\text{Na}_2\text{S}]} \times 100 = \frac{[\text{Na}_2\text{S}]}{AA} \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

$$Act = \frac{[\text{NaOH}] + [\text{Na}_2\text{S}]}{[\text{NaOH}] + [\text{Na}_2\text{S}] + [\text{Na}_2\text{CO}_3]} \quad \text{Equação 6}$$

Neste teste, a 5 ml de licor adicionou-se 50 ml de água e 25 ml de BaCl_2 (a 10%) (este último obrigou à precipitação dos carbonatos sob a forma de BaCO_3) e umas gotas de fenolftaleína. Utilizou-se o ácido clorídrico 0,5 M na titulação desta solução.

3.1.3 Procedimento experimental utilizado nos cozimentos kraft

As pastas kraft foram obtidas através de cozimentos laboratoriais realizados no Raiz, num digestor laboratorial de circulação forçada com capacidade de 6,5 L (modelo 409 MII da M/K Systems, inc., Bethesda, MD, USA) e com um caudal máximo de recirculação do licor de 2,5 L/min. Foram realizados ensaios de forma a varrer as várias fases do cozimento, com tempos e alcalinidades diferentes.

As condições de cozimento utilizadas foram as seguintes: razão líquido/madeira – 4:1, AA = 12%, 14%, 15% e 17%, IS = 28%, temperatura inicial - 40 °C, temperatura final - 160°C e velocidade de aquecimento - 1°C/min. (ver Figura 30)

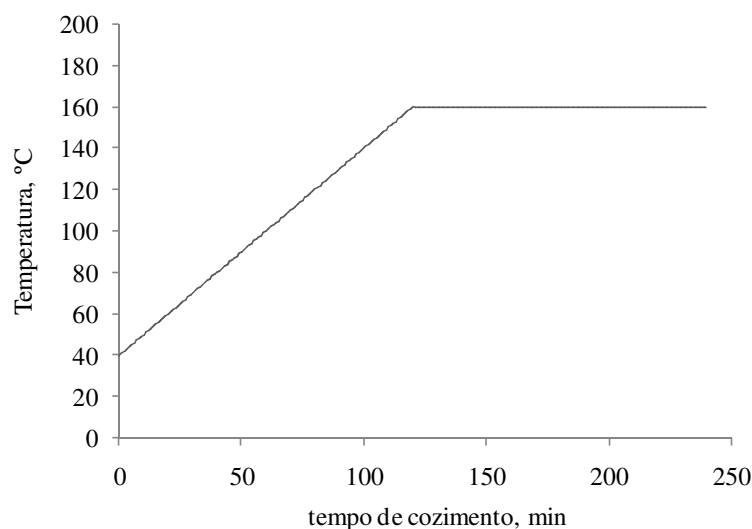


Figura 30 – Perfil da temperatura do cozimento.

Determinou-se o volume de licor branco e de água a se adicionar ao reactor de forma a garantir as condições de alcalinidade pretendidas e o volume de líquido estabelecido na razão líquido madeira. No cálculo do líquido foi contabilizado o volume de água existente nas aparas.

No final de cada cozimento as pastas e os incozidos (aparas parcialmente cozidas) foram colocados num desintegrador durante 5 min e recolhidos num saco. Procedeu-se a uma lavagem exaustiva com água para retirar a maior parte do licor negro, seguida de centrifugação. Esta pasta foi então crivada e foram recolhidos os incozidos para posteriormente se calcular o seu teor em cada cozimento.

A pasta crivada foi mantida num saco de malha estreita, bastante permeável, dentro de água. A pasta foi sendo centrifugada e mantida em água limpa até que a condutividade das águas de lavagem fosse inferior a 50 mS/cm. Depois da última centrifugação, as fibras da pasta foram separadas manualmente.

Todas as pastas foram pesadas e sua humidade final determinada de forma a calcular o rendimento final. Foi ainda determinado o IK através da norma NP3186.

O licor negro resultante do cozimento foi recolhido assim que o reactor atingiu a pressão atmosférica, foi deixado arrefecer e passou-se N_2 durante 15 min para expulsar o oxigénio. O licor negro foi mantido no frio (4°C) para posterior utilização.

3.2 XILANAS DA MADEIRA, DA PASTA E DO LICOR NEGRO

3.2.1 Extracção das xilanas da madeira e das pastas

As xilanas das pastas e da madeira foram removidas através de uma extracção alcalina com KOH_{aq} a 10% e de uma posterior precipitação sob etanol. Foi determinada a humidade à madeira e a todas as pastas para posterior cálculo do rendimento de extracção.

1,5-2g de pasta moída foram dispersas em água sob agitação vigorosa durante 1 hora. À pasta previamente filtrada adicionou-se 50 ml de uma solução aquosa de KOH a 10%, contendo 0,007g de NaBH_4 , e deixou-se a agitar durante 2 horas à temperatura ambiente (20 °C), sob uma purga contínua de N_2 . No final, a pasta foi filtrada e lavada com 30 ml de KOH_{aq} a 10% e 80 ml de água. Ao filtrado, que contém a xilana extraída da pasta, adicionou-se ácido acético glacial até um pH da solução de 5-6, sempre sob agitação, seguida da adição de etanol até perfazer um volume de 1000 ml, de forma a precipitá-las. A solução com as xilanas precipitadas foi mantida no frio durante 2 dias. Depois de aspirar a solução sobrenadante, as xilanas foram separadas por centrifugação e lavadas com 150 ml de metanol absoluto (3 vezes). As xilanas foram secas sob vácuo e pentóxido de fósforo. O rendimento de extracção foi determinado por pesagem.

3.2.2 Isolamento e precipitação das xilanas dissolvidas no licor negro

No caso específico do licor negro, é comum precipitar as xilanas existentes em solução através da precipitação ácida, depois da adição de 1,4-Dioxano que retém a lenhina em solução. Este método é bastante selectivo e permite obter xilanas bastante puras (148).

As hemiceluloses dos licores negros foram precipitadas e isoladas através de um deste método (148), apenas com algumas modificações. 200 ml de 1,4-dioxano foram adicionados lentamente e sob agitação contínua a 100 ml de licor negro, seguido de uma adição de ácido acético glacial até um pH de 5. A solução e o precipitado formado foram mantidos no frio durante 2 dias.

O precipitado foi separado por centrifugação e lavado sequencialmente com 150 ml de uma solução 1,4-dioxano-água (2:1), 150 ml de 1,4-dioxano, 150 ml de metanol absoluto e 150 ml de acetona, e seco sob vácuo e pentóxido de fósforo.

3.2.3 Determinação do teor de sólidos do licor negro

O licor negro foi caracterizado em relação ao teor de sólidos. O teor de sólidos foi determinado pela secagem sob vácuo e pentóxido de fósforo e posteriormente por três dias na estufa a 105 °C, até massa constante.

3.3 GLUCANAS DA MADEIRA, DA PASTA E DO LICOR NEGRO

3.3.1 Isolamento das glucanas das pastas e da madeira

Foram realizadas extracções à pasta e à madeira.

Para a extracção das glucanas da pasta (*GPHP*) pesaram-se aproximadamente 5 g de pasta à qual se adicionou 150 ml de água. A suspensão de pasta desintegrada foi colocada num reactor Parr em aço de 300 ml com agitação mecânica contínua durante uma hora, a 120 °C, com controlo de temperatura e pressão. A suspensão foi filtrada a quente e a pasta lavada com água a ferver. A precipitação das glucanas foi promovida pela adição de ácido fórmico, até pH 2, e por adição de uma mistura metanol:etanol até perfazer o volume de 1000 ml. Deixou-se no frio durante 3 dias. O precipitado foi separado do sobrenadante por centrifugação, tendo sido lavado com etanol e acetona antes de se colocar a secar sob vácuo e na presença de pentóxido de fósforo.

A madeira usada na extracção das glucanas foi previamente moída e crivada de forma a obter a fracção com o tamanho inferior a 60 mesh. Foi posteriormente extraída com a mistura de solventes etanol:tolueno (1:2) durante 8 horas.

A metodologia utilizada na extracção das glucanas da madeira foi idêntica à utilizada na pasta. Foram realizadas extracções com H₂O e com uma solução aquosa de NaOH_{aq} 0,05M, usando tempos de extracção de 2 horas.

As amostras de glucana extraída foram posteriormente isoladas e purificadas utilizando para tal diferentes metodologias, resultando em amostras com composições diferentes.

Amostras:

GMAPp – Depois da extracção com a solução aquosa de NaOH 0,05M, a glucana foi isolada e purificada usando a metodologia de precipitação utilizada na amostra *GPHPp*.

GMHPp – Depois da extracção com H₂O durante 2 horas, a madeira foi filtrada e lavada com 150 ml de água a ferver. Recolheu-se todo o filtrado ao qual foi adicionado ácido fórmico até um pH = 2. A precipitação das glucanas foi promovida com a adição de uma mistura metanol:etanol até perfazer o volume de 1000 ml. Deixou-se no frio durante 3 dias. O precipitado foi separado do sobrenadante por centrifugação, tendo sido lavado com etanol e acetona antes de se colocar a secar sob vácuo e na presença de pentóxido de fósforo.

GMHLz – Depois da extracção com H₂O durante 2 horas, a madeira foi filtrada e lavada com 150 ml de água a ferver. Todo o filtrado foi recolhido, concentrado no evaporador rotativo e liofilizado.

GMHDz – Depois da extracção com H₂O durante 2 horas, a madeira foi filtrada e lavada com 150 ml de água a ferver. Recolheu-se todo o filtrado, concentrou-se no evaporador rotativo e foi tratado com ácido peracético (5%), numa proporção de 100 ml de solução para 25 ml de ácido, a 90°C e durante 5 min. Depois de a amostra apresentar uma cor esbranquiçada, a solução foi neutralizada e dializada. Depois de 3-4 dias de diálise contra água, a amostra foi concentrada e liofilizada.

Devido ao alto teor em xilose, tentou-se purificar as amostras de glucanas por cromatografia de troca aniónica. Lavou-se a resina Amberlite IRA-400 com água abundante, fez-se passar uma solução de NaOH_{aq} a 5% (m/v) e voltou-se a passar a coluna por água até detecção de pH neutro no fundo da coluna. Carregou-se a coluna em iões Cl⁻, utilizando para tal o ácido HCl, até pH ácido e repetiu-se a passagem de água até pH neutro. Fez-se passar a amostra.

3.3.2 Perfil de extracção das glucanas e outros polissacarídeos

A determinação do perfil de extracção das glucanas e de outros polissacarídeos durante o cozimento foi realizado usando pequenas autoclaves a temperaturas de 90°C e 120°C e utilizando como solução de extracção água ou uma solução alcalina de NaOH_{aq}, 0,5M. Usaram-se tempos de extracção entre 10 min e 150 min à temperatura final.

Aproximadamente 2g de madeira moída (40 mesh), e extraída em etanol:tolueno, foi adicionada aos reactores pré-aquecidos juntamente com 30 ml de solução (água ou NaOH_{aq}, 0,5M). Para prevenir a compactação da madeira no interior do reactor, adicionaram-se bolas de vidro. Depois de fechados, os reactores foram colocados na estufa à temperatura final. Os reactores foram pré-aquecidos à temperatura final e depois de adicionada a solução deixou-se 30 minutos para garantir a temperatura pretendida no interior reactor. A agitação dos reactores foi garantida manualmente com intervalos de 20 minutos. Ao fim do tempo de reacção pretendido, deixou-se arrefecer e a madeira foi filtrada e lavada com 60 ml de água a ferver. A madeira foi seca na estufa a 40°C.

A quantidade de polissacarídeos extraídos foi determinada gravimetricamente.

3.4 CARACTERIZAÇÃO DE PASTAS, XILANAS E GLUCANAS

3.4.1 Determinação do teor de cinzas

O teor de cinzas foi determinado de acordo com a norma Tappi – T-211om-93. A parte orgânica é incinerada a 525°C e a parte inorgânica é determinada como cinzas, resultantes desta incineração.

Os cadinhos a serem utilizados com as amostras foram levados previamente à mufla durante 1 h a 525°C de forma a calcinar eventuais impurezas e a eliminar a água existente nos seus poros. Depois de arrefecer os cadinhos, colocou-se 1 g de amostra em cada um e levaram-se à mufla durante 4-5 horas a 525°C.

A determinação do teor de cinzas é feita através da razão entre a massa de cinzas obtida no final e a massa inicial de amostra colocada no cadinho.

3.4.2 Análise da composição em monossacarídeos

A composição em monossacarídeos de pastas, madeira, hemiceluloses e glucanas isoladas é normalmente o primeiro passo na caracterização deste tipo de amostras. Depois de realizada a hidrólise dos polissacarídeos em monómeros, a composição é determinada normalmente por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) ou por cromatografia gasosa (GC) (164-166).

Foi realizada a análise da composição em monossacarídeos à madeira, às várias pastas, às xilanas e às glucanas, tendo sido submetidas inicialmente ao método de hidrólise de Saeman (166) (tratamento das amostras com H_2SO_4 72% por 3 horas a 25 °C, seguido de hidrólise com H_2SO_4 diluído por adição de 4,4 ml durante 3 horas a 100 °C). Depois de reduzidas e acetiladas, a composição das amostras em monossacarídes foi determinada como acetatos de alditol por cromatografia gasosa (167).

A 10 mg de amostra foram adicionados 400 μL de H_2SO_4 72% e deixou-se sobre hidrólise forte durante 3 horas e a 25°C, de forma a quebrar os polissacarídeos em oligossacarídeos. A hidrólise fraca, que hidrolisa os oligómeros em monómeros, foi feita pela adição de 4,4 ml de água e deixou-se a reagir a 100°C durante 2,5 horas. Depois de arrefecer em gelo, adicionou-se 200 μl de padrão interno (2-deoxiglucose) e a 1 ml de hidrolisado procedeu-se à sua redução pela adição de 0,2 ml de NH_3 a 25% (para neutralizar a solução) e 0,1 ml de NH_3 3M com 150mg/ml de NaBH_4 . Deixou-se a 30°C durante 1 h. Ao fim deste tempo, neutralizou-se a solução com 2 adições de 50 μl de ácido acético glacial, para decomposição do excesso de NaBH_4 . Posteriormente separou-se 0,3 ml da amostra e procedeu-se à acetilação através da adição de 0,45 ml de 1-metilimidazola e 3 ml de anidrido acético. Deixou-se a reagir por 30 min a 30°C. Finalmente adicionou-se 3,75 ml de água destilada (para destruir o anidrido acético) e 2,5 ml de diclorometano para extrair os acetatos de alditol. Procedeu-se à agitação no vortex, à centrifugação, à aspiração da fase aquosa e repetiu-se a adição de água e diclorometano (3 ml e 2 ml, respectivamente). Após nova centrifugação e aspiração da fase aquosa, fez-se 3 lavagens com água (3 ml), alternadas com centrifugação e repetição da aspiração. No final evaporou-se o diclorometano sob fluxo de azoto e procedeu-se a adição de 1 ml de acetona e posterior evaporação em azoto (3 vezes).

A curva de calibração foi feita através de soluções padrão, tendo estas sido sujeitas ao mesmo procedimento que as amostras.

Os acetatos de alditol foram analisados num cromatógrafo de gás Varian 3350 (GC), equipado com uma coluna capilar DB-225 J & W (30 m x 0,25 mm i. d., com 0,15 µm de espessura de filme). O programa de temperaturas do cromatógrafo: 220°C (4 min) - 230 °C (5,6 min), velocidade de aquecimento de 25 °C/min; temperatura do injector: 220 °C, temperatura do detector: 230 °C.

3.4.3 Determinação do teor em ácidos urónicos

Uma parte importante na caracterização das xilanas é a quantificação dos ácidos urónico. Uma forma de os quantificar envolve a degradação selectiva e uma posterior análise dos produtos de degradação por cromatografia e/ou espectroscopia. Hoje em dia, a maioria dos métodos usados para a quantificação destes ácidos é feita através da hidrólise ácida. A hidrólise mais selectiva ocorre, neste caso, a pHs entre 3 e 4 (165).

A determinação dos ácidos urónico foi feita através do método de Blumenkrantz e Asboe-Hansen (168) com modificações. Colheu-se uma aliquota (0,5 ml) obtida ao fim de 1 hora da hidrólise fraca da análise de monossacarídeos (ver capítulo 3.4.2). Esta aliquota foi diluída 4 vezes e separada em 3 tubos de ensaio (cada um com 0,5 ml). A cada tubo foi adicionado 3 ml de uma solução de borato de sódio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) 75 mM em ácido sulfúrico concentrado, e após agitação, aqueceu-se a solução resultante durante 10 min e a 100°C. Depois de arrefecer, adicionou-se a dois dos tubos 100 µl de m-fenilfenol (0,15% em NaOH 0,5%), e depois de se deixar as várias soluções finais no escuro, durante 30 min, leu-se a absorvância das amostras com m-fenilfenol a 520 nm, contra o branco (réplica sem m-fenilfenol).

A calibração foi feita com soluções padrão de ácido galacturónico.

3.4.4 Determinação do peso molecular médio

Neste trabalho o peso molecular médio foi determinado recorrendo à cromatografia de permeação em gel (GPC), também conhecida como SEC (cromatografia de exclusão molecular). Nesta técnica as moléculas são separadas tendo em conta o seu volume hidrodinâmico. Para a determinação correcta do peso molecular médio é necessário efectuar a calibração do aparelho com padrões apropriados, os Pululanos, que apresentam uma estrutura linear com uma relação entre o peso molecular e o volume hidrodinâmico idêntico ao da celulose.

As análises de GPC das várias amostras foram realizadas num aparelho PL-GPC 110 system (Polymer Laboratories) com duas colunas Plgel 10 μ m MIXED B 300 x 7.5 mm protegidos por uma pré-coluna Plgel 10 μ m (Polymer Laboratories Ltd., U.K.).

As colunas, a pré-coluna, o sistema de injeção e o detector (por índice de refração) foram mantidos a uma temperatura constante de 70°C. O eluente usado foi DMA com de LiCl a 0,1M com um fluxo de 0.9 ml/min.

Aproximadamente 2 mg de amostra (xilanas ou glucanas) foram dissolvidas em 50-70 μ L de N,N-dimetilacetamida (DMA) com 10% de LiCl (m/v). Deixou-se a agitar e as amostras mais difíceis de dissolver foram colocadas na estufa. Posteriormente as amostras foram diluídas com DMA até uma concentração aproximada de 0,4% (4 mg/ml).

A calibração das colunas de GPC foi feita com padrões de pululano (Polymer Laboratories) num gama de 800 a 100000 Da.

3.4.5 Análise de ligações por metilação

Para estudar a estrutura das xilanas, as ligações envolvidas nos polissacarídeos, foi feita a análise por metilação pelo método de Hakomori, com algumas alterações (169). A determinação da composição estrutural das hemiceluloses envolve a metilação total dos grupos hidroxilos, a hidrólise, a redução e por fim a acetilação dos grupos hidroxilo resultantes da clivagem das ligações glicosídicas, permitindo desta forma clarificar em que posições estas ligações estão situadas. Por fim os monossacarídeos metilados são analisados por GC-MS (23, 169, 170).

Aproximadamente 5 mg de amostra foi metilada com dois tratamentos consecutivos com iodeto de metilo em DMSO (NaOH foi usado para ionizar os grupos hidroxilos). Assim dissolveu-se bem a xilana em 2 ml de DMSO e depois de se passar N₂ durante 5 min, tratou-se com 1 pastilha de NaOH moída seguido de ultra-sons durante 1 min. A metilação foi feita através da adição de 1 ml de CH₃I e deixou-se sob agitação durante 4 horas. No fim da reacção fez-se passar N₂ para eliminar o excesso de CH₃I e adicionou-se 7,5 ml de água e H₂SO₄ (4%) até pH neutro. O material metilado foi purificado e recuperado por diálise contra água durante 3 dias e liofilizado. Repetiu-se o processo de metilação (169).

Depois da metilação procedeu-se à redução dos ácidos urónicos (169, 171, 172). Para tal adicionou-se às xilanas metiladas 2 ml de THF seco, e deixou-se a dissolver durante 2 horas a 40-45°C, sujeitando-as a ultra-sons de 15 em 15 min. Posteriormente adicionou-se 10 mg de LiAlD₄ disperso em 1 ml de THF e deixou-se a reagir durante 4 horas a 65°C. No fim da reacção destruiu-se o excesso de LiAlD₄ com a adição de etanol e água e neutralizou-se a solução com H₃PO₄, 2M. Centrifugou-se e separou-se o precipitado do sobrenadante, lavou-se o precipitado com 1 ml de THF e juntou-se os sobrenadantes para depois os levar à secura por evaporação. A amostra metilada foi hidrolisada com 1 ml de ácido fórmico, 90% durante 1,5 horas a 105°C e posteriormente com H₂SO₄, 0,15M durante 6 horas e à mesma temperatura (164, 169). A redução e a acetilação foram realizadas segundo o método descrito na análise de açúcares.

Os acetatos de alditol metilados foram identificados por GC-MS, num cromatógrafo de gás Trace GC 2000 series acoplado com um espectrómetro de massa Finnigan Trace MS, usando uma coluna capilar DB-1 J&W (30 m x 0.32 mm i.d., 0.25 µm de espessura de filme), usando o hélio como gás de arraste. O programa de temperatura utilizado foi: 120°C (2 min) - 225 °C (35 min), velocidade de aquecimento de 2 °C/min; temperatura do injector: 230 °C, temperatura do detector: 250 °C.

3.4.6 Espectroscopia de ¹H RMN, ¹H-¹H TOCSY e ¹H HSQC

As xilanas foram dissolvidas em D₂O, tendo sido adicionado 3-(trimetilsilil)-propionato-d₄ de sódio como padrão interno (δ 0.000).

Os espectros de ^1H RMN (300MHz), a uma dimensão, foram realizados a 25 °C num espectrómetro Bruker AMX 300. Usou-se como condições: tempo de relaxamento - 6 s, r.f. pulse angle - 90° e n° de scans - 600.

Os espectros 2D de ^1H - ^1H TOCSY (τ mix = 0.050 s) e HSQC foram obtidos no mesmo espectrómetro (Bruker AMX 300) usando o programa MLEVST standard pulse. Para a espectroscopia de 2D de ^1H - ^1H TOCSY foi utilizada em ambas as dimensões uma largura espectral de 2185 Hz. O tempo de relaxamento empregue foi de 1,5 segundos. Para cada FID foram adquiridos 128 transitórios, o tamanho da matriz de dados foi de 1024 in em t_1 por 512 em t_2 .

O espectro de ^1H HSQC foi adquirido sobre um peso espectral F1 de 12,000 Hz e uma largura F2 de 2000 Hz, com uma matriz de 2048x1024 e um incremento de 128 transitórios. O tempo de relaxamento entre scans foi de 2 segundos e o de transferência de polarização foi optimizado para $1J_{\text{CH}}$ 150 Hz.

3.4.7 FTIR

Foi feita a análise por espectroscopia de FTIR às amostras extraídas da madeira com água (*GMHDz*, *GMHPp*).

Os espectros foram obtidos num espectrómetro de FTIR Brücker IFS equipado com uma célula única horizontal Golden Gate ATR.

3.4.8 Hidrólise enzimática

As glucanas extraídas da madeira foram sujeitas a uma hidrólise enzimática. A enzima utilizada foi a Econase[®] HC-400 que foi gentilmente cedida pela ABenzimes. A sua actividade principal é de endo-xilanase, embora contenha outras actividades (β -glucanase, celulase e amiloglucosidase). A actividade mínima da xilanase é de 400000 BXU/g, a da endo- β -glucanase é de 60000 BU/g e da endo-celulase é de 8000 ECU/g.

1 ml de Econase HC-400 foi purificada numa coluna Sephadex PD-10. Pesou-se aproximadamente 20 mg de amostra e dissolveu-se em 2 ml de acetato de sódio (pH=4) a

40°C durante 15 min. Depois de se adicionar 200µl de enzima purificada deixou-se reagir durante 3 horas a 40°C e guardou-se no congelador.

3.4.9 Fraccionamento dos oligossacarídeos.

Os oligossacarídeos obtidos pela hidrólise enzimática foram fraccionados por cromatografia de afinidade/exclusão molecular (LEX/SEC) semi-preparativa (bomba Knauer K-1001, detector RI Knauer K-2401). Foi usada uma coluna Shodex sugar KS 2002 (Showa Denko K.K.) (300 mm x 20 mm) a 30°C e usando água ultra-pura (a pH=6,5) como eluente, com um fluxo de 2,80 ml/min. Injectou-se 500 µl da solução de glucana e as diferentes fracções de oligómeros foram recolhidos para posterior análise por espectrometria de massa.

3.4.10 Espectrometria de massa

As amostras foram analisadas por espectrometria de massa com ionização por electrospray (ESI-MS, ESI-MS/MS e ESI-MSⁿ). Os espectros de ESI-MS e ESI-MS/MS foram obtidos num espectrómetro de massa híbrido Q-TOF 2 (Micromass, Manchester, UK). Os oligómeros presentes nas amostras ionizaram em ESI sob a forma de aductos de sódio, $[M+Na]^+$. Para confirmar as estruturas foi feito o estudo de fragmentos de aductos de Sódio, $[M+Na]^+$.

Para as análises de ESI dissolveram-se as amostras em metanol/água/ácido fórmico na proporção 50:50:0,1 (v/v/v). Foi usada uma voltagem no cone de 35V e no capilar de 3 kV. A temperatura na fonte foi de 80°C e a temperatura de solvatação foi de 150°C. Injectaram-se as amostras a um caudal constante de 10 µL/min na fonte de ESI. Usou-se uma resolução para o analisador de tempo de voo (ToF) de aproximadamente 9000 nos ensaios de MS e MS/MS. Os espectros de MS/MS foram obtidos utilizando o argon como gás de colisão, e variando a energia de colisão entre os 40 e 70 eV.

Os espectros obtidos foram processados usando o software MassLynx software (versão 4.0).

As análises de ESI-MSⁿ foram realizadas num espectrómetro de massa com um analisador de trapa de iões linear LXQ (Finningan). O espectro de massa (ESI-MS), no intervalo de m/z 100 a m/z 1500, foi adquirido no modo positivo. O capilar foi mantido a 350°C e em cada experiência os parâmetros de transmissão de iões foi optimizada automaticamente de forma a melhorar a detecção do analito em questão. Para estas análises a fracção ácida foi dissolvida numa mistura de metanol:água:ácido fórmico (50:50:0.1, v/v/v). O caudal empregue foi de 8µl/min e a voltagem aplicada de 5.5 kV. O gás usado como nebulizador e como gás de secagem foi o Nitrogénio. Nas experiências de MSⁿ as energias de colisão variaram entre 15 e 25 das energias de colisão normalizadas (unidades arbitrárias).

Os padrões usados nas análises de ESI-MSⁿ foram produtos comerciais: Maltose (Riedel, Buchs, Switzerland), isomaltose (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain), galactobiose (β-1,4) (Megazyme, Wicklow, Ireland) e galactobiose (β-1,6) (Dextra Laboratories Ltd, United Kingdom).

3.4.11 Quantificação do teor e determinação das absortividades da amilopectina e da amilose

Os complexos de amilopectina-iodo e amilose-iodo podem ser detectados colorimetricamente, pois apresentam uma cor característica (iodo-amilose (azul-arroxead) e iodo-amilopectina (violeta)), absorvendo no visível a comprimentos de onda máximos específicos. A determinação da quantidade de amilose e amilopectina nas amostras extraídas com água só é possível através do conhecimento da absortividade das duas espécies absorventes. Para determinação das absortividades de cada uma das espécies foram realizados várias medidas com concentrações diferentes. Para tal utilizou-se a equação de Lambert-Beer (173).

Foi feito o varrimento a todos os comprimentos de onda para todas as concentrações usadas de ambas as espécies de forma a determinar com maior rigor o comprimento de onda ao qual a absorção é máxima. Viu-se que a absorção máxima da amilose é por volta dos 655 nm e a da amilopectina por volta dos 551 nm (174). As absortividades foram

medidas usando amilose e amilopectina comerciais. Os resultados obtidos estão esquematizados na Tabela 5.

Tabela 5 – Comprimentos de onda máximos e o coeficiente de absorção respectivo, ϵ (em $\text{ml.mg}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).

	Comprimento de onda, λ	
	655,5 nm	551 nm
ϵ amilose:	21,8	13,3
ϵ amilopectina:	7,9	14,0

Para a determinar a quantidade de amilose e de amilopectina usou-se 1 ml da solução de glucanas extraída da madeira à qual se adicionou 7 ml de água e 0,96 ml de solução de iodo. A solução resultante foi analisada por UV-Vis aos comprimentos de onda de 551,0 nm e 655,5 nm. Aos resultados obtidos na análise de UV-Vis, foram retiradas as contribuições da solução de iodo e da solução glucanas.

A solução de iodo foi preparada com as concentrações de 2 mg I_2 e 20 mg de KI por cada ml de água (175).

Uma vez que ambas as espécies absorvem aos máximos de absorção de cada uma é necessário entrar com a contribuição de ambas na quantificação da absorção a cada comprimento de onda (λ). (ver Equação 7 e Equação 8)

$$C_{\text{amilos, mg/mL}} = \frac{A_{655,5} \times \epsilon_{551}^{\text{amilop}} - A_{551} \times \epsilon_{655,5}^{\text{amilop}}}{\epsilon_{655,5}^{\text{amilos}} \times \epsilon_{551}^{\text{amilop}} - \epsilon_{551}^{\text{amilos}} \times \epsilon_{655,5}^{\text{amilop}}} \quad \text{Equação 7}$$

$$C_{\text{amilp, mg/mL}} = \frac{A_{551} \times \epsilon_{655,5}^{\text{amilos}} - A_{655,5} \times \epsilon_{551}^{\text{amilos}}}{\epsilon_{655,5}^{\text{amilos}} \times \epsilon_{551}^{\text{amilop}} - \epsilon_{551}^{\text{amilos}} \times \epsilon_{655,5}^{\text{amilop}}} \quad \text{Equação 8}$$

3.5 ESTUDOS DE PRECIPITAÇÃO DE XILANAS

3.5.1 *Precipitação em pastas kraft cruas por abaixamento do pH do licor negro.*

Para promover a precipitação das xilanas foi usada uma pasta kraft com 65 minutos a 160 °C e o licor negro correspondente. A precipitação foi feita através da adição de quantidades crescentes de ácido sulfúrico.

O licor negro (~ 500 ml) foi previamente aquecido até uma temperatura aproximada de 50 °C e adicionado à pasta (~ 30g a.s.), colocada anteriormente num reactor Büchi de vidro. A reacção foi realizada com agitação mecânica, manga de aquecimento com uma temperatura de 90°C e pressão atmosférica.

Tabela 6 – Perfil da adição de ácido sulfúrico. A quantidade total de solução adicionada à reacção foi de 20 ml, sendo a diferença entre a quantidade de ácido e volume final perfeito com água.

Pasta do licor com pH	Ácido adicionado (ml)	IK
12,8	-----	12,9
12,7	0	14,1
12,0	2	14,1
11,7	2,4	15,2
11,5	2,7	14,8
11,3	3,2	14,8
11,0	4,0	15,5
10,7	5,0	18,3
10,5	6,5	19,4

O cálculo do volume de licor negro a adicionar foi feito para que a consistência da mistura licor-pasta fosse aproximadamente de 6%, entrou-se com a quantidade de água que a pasta continha. Foi controlado o perfil de temperatura. O ácido sulfúrico foi adicionado ao fim de 50 minutos, a uma temperatura aproximada de 80°C, e deixou-se reagir durante mais 15 minutos (Tabela 6).

No fim da reacção, a pasta foi filtrada e lavada com água abundante até remoção total do licor negro. As reacções a pH mais baixo (pH = 10,45 e 10,03) a filtragem e lavagem foram muito difíceis devido à grande quantidade de lenhina precipitada. As pastas lavadas foram deixadas a secar ao ar para posterior análise.

3.5.2 Precipitação de xilanas em pasta kraft branqueada.

Para a precipitação das xilanas foi usada uma pasta branqueada de *E. globulus* moída a 40 mesh. As xilanas utilizadas foram extraídas do licor negro e mantidas em H₂O e no frio

A 18g de pasta foi adicionada uma quantidade total de 300g de solução conforme a Tabela 7. A solução de xilanas foi preparada usando 50g de xilanas e 150g de NaOH_{aq} (10g/L). A solução alcalina usada na reacção foi a mesma que foi usada para a preparação da solução de xilanas. A quantidade exacta de xilanas adicionada à reacção foi definida através da determinação de teor de sólidos da solução final de xilanas.

Tabela 7 – Perfil da adição das soluções de NaOH_{aq} e de xilanas.

Amostra	NaOH _{aq} adicionado	Solução de xilanas adicionada, g	Quantidade exacta de xilanas adicionada, g
Branco	300 g	0	0
Xil-I	270 g	30	1,9
Xil-II	240 g	60	3,7

Depois de adicionar as soluções de NaOH_{aq} e de xilanas à pasta, deixaram-se em contacto duas horas a 160 °C, num reactor batch com agitação mecânica. Ao fim das duas horas, deixou-se arrefecer até 50 °C, filtrou-se e lavou-se a pasta abundantemente com água. A pasta filtrada foi seca numa estufa de vácuo a 50 °C durante um dia.

3.5.3 Precipitação de xilanas em fibras celulósicas

Na maioria das reacções de precipitação foram utilizadas fibras de celulose comerciais (cotton linters) e xilana de bétula comercial. A fibra de celulose comercial é uma fonte de celulose pura, sem xilanas nem lenhina, de forma a poder estudar a precipitação ou absorção sem a interferência de outros compostos, que se encontram na pasta e na madeira.

Os parâmetros estudados foram a concentração de xilana, o tempo de contacto entre a solução e as fibras, o pH da solução, a fonte de celulose e o tipo de xilana.

As concentrações de xilana usadas foram: 0,1g, 0,2g e 0,5g de xilana por 30 ml de solução, que correspondem a 3,3g/L, 6,7g/L e 16,7g/L, respectivamente.

Os tempos de reacção utilizados foram: 30 min, 60 min, 90 min e 150 min.

Os valores de pH utilizados na solução de xilanas foram: 10 e 12

As fontes de celulose utilizadas foram: fibras longas – cotton linters da sigma-aldrich, algodão comercial e pasta kraft de *Eucalyptus globulus* branqueada.

As xilanas utilizadas foram: xilana comercial extraída da madeira de bétula - sigma-aldrich e xilana isolada e precipitada do licor negro do cozimento kraft de *Eucalyptus globulus*.

As precipitações foram realizadas em tubos de vidro roscado com capacidade de 50 ml e resistência a uma temperatura máxima de 120°C. O volume de solução usado foi de 30 ml para 1g de fibras de cotton linters. Nos ensaios com fibras de algodão comercial e pasta branqueada usaram-se apenas 100mg de fibras.

Prepararam-se soluções de NaOH_{aq} a pH=10 e a pH=12. Dissolveram-se as xilanas nas soluções alcalinas a 90°C durante 15-20 minutos (para pH=10) e 5-10 minutos (para pH=12), e depois de arrefecerem corrigiu-se o pH para o pH inicial. Adicionou-se a solução de xilanas às fibras e deixou-se a reagir a 115°C num banho de óleo durante o tempo pretendido. A agitação no interior dos tubos foi garantida através de agitadores magnéticos. A suspensão de fibras foi retirada do banho de óleo, deixada arrefecer e foi, posteriormente, filtrada e lavada com água abundante. O pH da solução de xilana final foi medido. As fibras, depois de lavadas foram secas na estufa a 40°C.

3.5.4 Extracção das xilanas precipitadas nas pastas kraft

Foram extraídas as xilanas das pastas obtidas na precipitação por abaixamento do pH do licor negro. Uma vez que se pretendia extrair apenas as que se encontravam na superfície a extracção com KOH_{aq} 10% foi feita apenas durante 17 min. O restante procedimento está descrito anteriormente no capítulo 3.2.1

3.5.5 Determinação do Índice Kappa (IK)

A determinação do IK das várias pastas foi feita segundo o procedimento descrito na norma NP 3186. As quantidades utilizadas na determinação deste parâmetro nas pastas resultantes da precipitação com abaixamento do pH do licor negro foram $\frac{1}{4}$ das mencionadas na norma.

3.5.6 Determinação dos teores de lenhina e de ácido hexenurónico

Como foi visto anteriormente a determinação de ácidos urónicos pode ser feita através de uma hidrólise ácida, mas existe também um método bastante simples e rápido que se baseia na dissolução das pastas em cadoxeno e posterior determinação por espectrometria de UV. Este método permite a quantificação simultânea dos HexA e da lenhina presentes na pasta (176).

Assim a determinação dos teores de lenhina e de HexA nas diferentes pastas foi feita através deste método espectrofotométrico descrito em (176), com ligeiras alterações.

Deixou-se a agitar, durante 3 horas, aproximadamente 25 mg de pasta moída dissolvida em 15 ml de cadoxeno. Ao fim da agitação, deixou-se no frio durante 24 horas, de forma a facilitar a dissolução da pasta em cadoxeno. A solução de pasta obtida é deixada a agitar durante mais 15 min, depois de diluída com 15 ml de água. Depois de filtrada para eliminar o que não se conseguiu dissolver, mediu-se a absorvância a 490 nm, 280 nm e no máximo de absorvância (por volta dos 231 nm), de forma a se calcular as quantidades de lenhina e de ácido hexenurónico nas várias amostras.

Para calcular os teores de lenhina e de ácido hexenurónico nas pastas utilizou-se da Equação 9 à Equação 12.

$$C_{Lig, g/L} = \frac{A_{280} \times \epsilon_{231}^{HexA} - A_{231} \times \epsilon_{280}^{HexA}}{\epsilon_{231}^{HexA} \times \epsilon_{280}^{Lig} - \epsilon_{231}^{Lig} \times \epsilon_{280}^{HexA}} \quad \text{Equação 9}$$

$$C_{HexA, g/L} = \frac{A_{231} \times \epsilon_{280}^{Lig} - A_{280} \times \epsilon_{231}^{Lig}}{\epsilon_{231}^{HexA} \times \epsilon_{280}^{Lig} - \epsilon_{231}^{Lig} \times \epsilon_{280}^{HexA}} \quad \text{Equação 10}$$

$$HexA = \frac{C_{HexA} \times V}{m \times M} \quad \text{Equação 11}$$

$$Lig, \% = \frac{C_{Lig} \times V}{m} \times 100 \quad \text{Equação 12}$$

Onde C_{HexA} é a concentração de HexA, C_{Lig} a concentração da lenhina, A_{280} e A_{231} as absorvâncias medidas a 280nm e a 231nm, respectivamente, ϵ_{280} e ϵ_{231} as absortividades a 280nm e a 231nm, respectivamente, do HexA e da lenhina, V o volume total da solução, m a massa de pasta seca e M a massa molar de HexA (176 g/mol). Onde $\epsilon_{280, lig} = 17,3$ g/L, $\epsilon_{231, lig} = 34$ g/L, $\epsilon_{280, HexA} = 3,8$ g/L e $\epsilon_{231, HexA} = 31,8$ g/L (176).

3.5.7 Determinação do teor de grupos carboxilo

A determinação dos grupos carboxilo nas pastas foi feita através de um método descrito em (177), com ligeiras alterações.

A 2-2,5g de pasta moída adicionou-se 250 ml de HCl_{aq} 0,1M e deixou-se agitar durante 5 horas. Depois de se filtrar, lavou-se a pasta até pH neutro e pesou-se de forma a quantificar o excesso de água. A esta pasta adicionou-se 50 ml da mistura $NaHCO_{3aq}$ 0,01M e $NaCl_{aq}$ 0,1M e deixou-se a reagir durante 24 horas, no escuro e à temperatura

ambiente. Ao fim das 24 horas, filtrou-se e titulou-se 25 ml do filtrado com HCl_{aq} 0,01M, usando vermelho de metilo como indicador.

A concentração de grupos carboxilos $[\text{COOH}]$ foi determinada através da Equação 13.

$$[\text{COOH}] = \left(b - a - \frac{V \times a}{50} \right) \times \frac{50}{25 \times m} \quad \text{Equação 13}$$

Onde a é o volume em mL de HCl_{aq} 0,01M consumido na titulação do filtrado da pasta, b é o volume em mL de HCl_{aq} 0,01M consumido na titulação do branco, V é o volume de água destilada na pasta depois de filtrada e m é a massa de pasta seca.

3.5.8 ESCA ou XPS

As pastas resultantes dos ensaios de precipitação por abaixamento do pH do licor negro foram analisadas por ESCA ou XPS (Espectroscopia fotoelectrónica de raio-X). Parte das amostras analisadas foram previamente extraídas com acetona. Todas as amostras foram prensadas manualmente de forma a obter uma folha para posterior análise.

Os espectros de XPS da superfície das folhas de pasta foram obtidos com um Physical Electronics PHI Quantum 2000 ESCA, equipado com uma fonte de raio-X monocromática $\text{AlK}\alpha$, operado a 25W com uma combinação de um canhão de electrões com o bombardeamento de iões para compensação de carga.

O ângulo inicial foi de 45° em relação à superfície das amostras. A superfície analisada tinha uma área aproximada de $500 \times 400 \mu\text{m}$, e pelo menos 3 pontos distintos de cada amostra foram analisados.

3.5.9 ToF-SIMS

A técnica de TOF-SIMS (Espectrometria de massa de iões secundários por tempo de voo) foi aplicada às pastas resultantes dos ensaios de precipitação por abaixamento do pH do licor negro.

Os espectros de massa dos iões secundários foram obtidos com um espectrómetro Physical Electronics ToF-SIMS TRFT II. Um feixe de ião primário com fonte de ião metálico líquido de $^{69}\text{Ga}^+$ (LIMS) com uma voltagem aplicada de 15kV, uma corrente de 600 pA e uma largura de pulso de 20ns, foram usados em ambos os modos positivo e negativo. Os espectros foram adquiridos, durante 6 minutos, com um fluxo de iões de aproximadamente 10^{12} iões/cm², de forma a assegurar condições estáticas. A compensação de carga foi feita com um pulso de canhão de electrões fora de fase em relação à fonte de iões. A zona analisada tinha uma área aproximada de 200x200µm, e pelo menos 3 pontos distintos de cada amostra foram analisados.

3.5.10 Peeling enzimático e análise de monossacarídeos por HPLC

As amostras tratadas por este método foram as pastas kraft convencionais, as pastas kraft não branqueada com xilanas precipitadas por abaixamento do pH do licor negro (capítulo 3.5.1), pastas kraft branqueadas com xilanas precipitadas (capítulo 3.5.2) e algumas amostras de fibras celulósicas com xilanas precipitadas (capítulo 3.5.3).

As amostras foram previamente moídas para melhorar o acesso das enzimas às fibras.

O procedimento deste método foi fornecido por Lenzing AG.

Misturaram-se as enzimas Celluclast e Econase numa proporção de 2:1. De forma a reduzir a composição em monossacarídeos que as enzimas puras têm, a mistura foi purificada usando uma coluna Sephadex PD-10. Assim, acondicionou-se a coluna com 25 ml de água, e depois de adicionar 2,5 ml da mistura de enzimas à coluna eluiu-se com 3,5 ml de água. As enzimas foram recolhidas na base da coluna e repetiu-se este procedimento. As enzimas purificadas deverão ser utilizadas no mesmo dia que foram preparadas.

Para a hidrólise enzimática pesou-se rigorosamente 20 mg de pasta, adicionou-se 1,7 ml da solução padronizada de acetato de sódio a pH=4 e 100 µl de padrão interno de fucose e deixou-se num banho a 40°C durante 15 min.

Ao fim deste tempo foram adicionadas 200 µl da solução de enzimas purificada e deixou-se a reagir durante vários tempos. Os tempos de reacção variaram entre 15 seg. e 60

min. Desta forma consegue-se determinar a composição em monossacarídeos a várias profundidades da fibra.

Após o tempo de reacção pretendido, a suspensão é filtrada de forma a retirar as fibras que não queremos que reajam mais e assim parar o peeling. Usou-se um filtro 0,45 µm PTFE. Deixou-se a solução filtrada durante mais 24 horas num banho a 40 °C e sob agitação de forma a garantir a completa hidrólise dos sacarídeos que existam em solução. Após 24 horas de reacção uma aliquota de 10 µl da amostra é diluída com a adição de 990 µl de água e determinou-se a composição em monossacarídeos por cromatografia líquida de alta performance (HPLC).

Para a quantificação dos monossacarídeos usou-se um cromatógrafo de sistema Dionex, com uma coluna Dionex CarboPac PA10 250*4 mm e um detector Dionex ED40 no modo de pulso amperométrico.

As calibrações foram feitas com padrões de glucose e xilose.

3.5.11 Análise de imagem (microscopia óptica e SEM)

Estas técnicas permitem observar a superfície das fibras e tentar distinguir algumas diferenças que possam existir entre elas.

As várias fontes de celulose foram analisadas por microscopia óptica de forma a compreender as diferenças morfológicas das diferentes fibras. Esta análise foi realizada num microscópio óptico Olympus BX51 com uma máquina digital Olympus C-4040zoom, 4.1 Megapixel, acoplada. As imagens foram adquiridas com luz reflectida (em campo escuro, luz não polarizada) e luz transmitida, com filtro de luz de dia, com ampliação de 20 e 50 vezes mais a ampliação das lentes situadas entre a câmara digital e a ocular.

A análise de imagem por SEM foi realizada num microscópio electrónico FEG-SEM Hitachi S4100 que opera com aceleração 25kV. As amostras, no estado sólido, foram coladas com cola de carbono a um suporte metálico, e cobertas com um filme de carbono, antes de serem analisadas.

3.5.12 Difracção de raios-X

A difracção de raios-X permite determinar o grau de cristalinidade de compostos. As amostras analisadas por esta técnica foram as fibras de cotton linters (Cotton), de algodão comercial (AlgC), de pasta kraft branqueada (Pbranq) e pasta kraft branqueada extraída (PbranqEx). As amostras foram analisadas sob a forma de pastilha num difractómetro Philipps X’pert MPD com radiação CuK_α ($\lambda=0.154\text{nm}$), com velocidade de varrimento de $0.02^\circ/\text{scan}$ e 2θ na gama $4\text{-}40^\circ$. O grau de cristalinidade foi determinado segundo as Equação 14 e Equação 15 (178).

$$GC_0 = \frac{I_{c1} + I_{c2}}{I_{total}} \cdot 100 \quad \text{Equação 14}$$

$$GC = GC_0 \cdot \left[1 + K \cdot \left(\frac{1}{w} - 1 \right) \right] \quad \text{Equação 15}$$

Onde GC_0 é o grau de cristalinidade, GC é o grau de cristalinidade corrigido para a presença de material não celulósico, K é uma constante (0.3), w é a proporção relativa de glucose, I_{total} é a área total ($I_{amorfo} + I_{c1} + I_{c2}$) e I_{amorfo} , I_{c1} e I_{c2} são as áreas correspondentes às regiões amorfa e cristalinas da celulose.

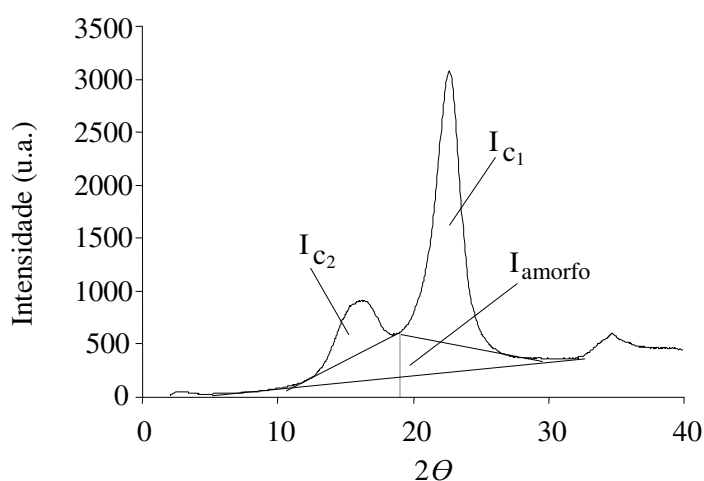


Figura 31 - Identificação das áreas de I_{c1} , I_{c2} e I_{amorfo} no difractograma da celulose.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 COMPORTAMENTO DAS XILANAS NO COZIMENTO KRAFT

O primeiro grande objectivo desta parte do trabalho foi compreender o comportamento das xilanas durante o cozimento kraft e perceber se as xilanas dissolvidas no licor negro podem ser recuperadas por precipitação. Inicialmente foram seguidos os perfis de dissolução das xilanas no licor de cozimento e a de xilanas precipitadas por acidificação do licor negro final. Tendo em conta este primeiro objectivo, foi feita a caracterização das hemiceluloses ao longo do cozimento, de forma a entender em que fase deste processo se verificam as suas maiores alterações estruturais, e como é que estas se apresentam estruturalmente no fim do cozimento.

O segundo objectivo desta parte do trabalho foi perceber que alterações ocorrem nas xilanas se a alcalinidade do licor de cozimento for alterada e como é que essa alteração influencia a precipitação das xilanas do licor negro. Neste sentido foi feita a caracterização sumaria das xilanas obtidas às várias alcalinidades.

4.1.1 Perfil do comportamento e de extracção das xilanas ao longo do cozimento

Para a determinação do perfil de dissolução das xilanas da madeira no licor negro escolheram-se tempos de cozimento que varressem as várias fases do cozimento: 100 min (IK: nd) - correspondente à fase inicial, 155 min (IK: 17,9) e 170 min (IK: 13,8) - correspondentes à fase principal, 200 min (IK: 12,8) - correspondente à fase residual do cozimento (Figura 32). Estes testes foram realizados a 160°C, com um alcali activo de 17% e um índice de sulfureto de 28% (ver capítulo 3.1.3). Os rendimentos obtidos nestes cozimentos foram: 100 min - 79,7%, 155 min - 55,2%, 170 min - 54,7% e 200 min - 54,0%.

As xilanas do licor foram obtidas através do método de acidificação, na presença de 1,4-dioxano (148) (ver capítulo 3.2.2). A acidificação do licor negro (até pH=5), quando feita na presença de 1,4-dioxano, e depois de sucessivos passos de lavagem, resulta num precipitado composto essencialmente por polissacarídeos, maioritariamente hemiceluloses (148).

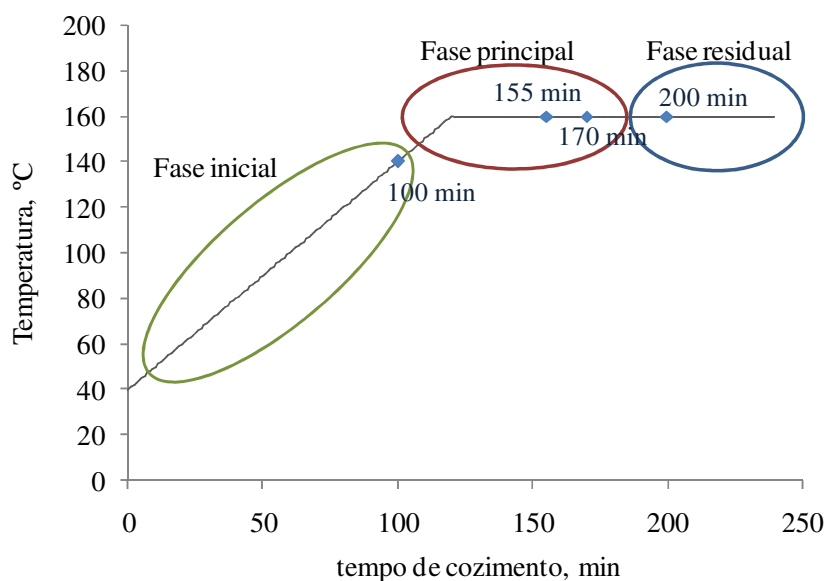


Figura 32 – Indicação das amostras recolhidas e das fases do cozimento correspondentes.

As xilanas das pastas e da madeira foram removidas através de uma extracção alcalina com KOH_{aq} 10% e de uma posterior precipitação sob etanol (ver capítulo 3.2.1). A extracção alcalina de xilanas é feita sob atmosfera de azoto, à temperatura ambiente ou inferior e na presença de borohidreto de sódio (NaBH_4) de forma a reduzir o terminal redutor das xilanas a álcool e prevenir a reacção de peeling. O uso KOH permite uma extracção mais selectiva em relação às xilanas, deixando parcialmente as glucomananas na madeira e na pasta (8, 32, 35, 37, 132, 179, 180).

Os polissacarídeos obtidos por estes dois métodos são caracterizadas por uma cor esbranquiçada, com teores de cinzas por volta dos 6% para os polissacarídeos precipitados do licor e 3-4% para as xilanas extraídas das pastas kraft e da madeira, com purezas por volta dos 90% e como tal com baixos teores de lenhina.

Para determinar o perfil de extracção das xilanas ao longo do cozimento caracterizou-se também o licor negro em relação ao teor de sólidos (Tabela 8) e à composição em monossacarídeos (Tabela 9). Compararam-se ainda estes valores com os teores de xilanas precipitáveis de forma a estimar a quantidade de xilanas passíveis de serem recuperadas.

Tabela 8 – Teor de sólidos e % de açúcares, m/m, madeira a. s. (AA = 17% e IS = 28%).

Tempo de cozimento, min	Teor de sólidos, %	Açúcares no total de sólidos, %
100	41,5	38,8
155	56,4	32,4
170	58,3	30,7
200	57,4	32,1

% de açúcares obtida por diferença entre a composição da madeira e a composição das pastas

Verificou-se nestes primeiros resultados que o teor de sólidos do licor negro se mantém aproximadamente constante depois de obtido um valor considerável no início a fase principal. Destes sólidos cerca de 30-40% são açúcares, os quais são dissolvidos preferencialmente no início do cozimento, face a outros compostos. Observa-se que na fase inicial o teor de açúcares é superior (38,8%), descendo de seguida para valores próximos de 30%, resultando de uma maior dissolução de lenhina e de uma diminuição da extensão da dissolução de xilanas (Tabela 8).

Os polissacarídeos dissolvidos no licor foram calculados como a diferença entre os monossacarídeos da madeira e os da pasta e a quantidade de xilanas é estimada como a composição em anidroxilose tanto na madeira, como na pasta e no licor. (Para estes cálculos foram consideradas perdas de massa na madeira de 1,4% em perdas processuais). Verificou-se que a concentração de xilanas no licor nas fases principal e residual apresenta um ligeiro aumento ao longo do cozimento, 14 para 14,5g/L (Tabela 9). Na fase inicial a concentração de xilanas no licor é cerca de 10g/L (Tabela 9) devido essencialmente às temperaturas menos drásticas e à menor acessibilidade que o licor tem às fibras. Nesta fase a estrutura da madeira ainda está bastante intacta, removendo-se da madeira menores quantidades de xilanas.

Durante o cozimento kraft e depois de uma expressiva primeira dissolução de polissacarídeos, observa-se uma pequena degradação e/ou dissolução dos polissacarídeos da fase inicial para a fase principal. Na fase principal e residual do cozimento (a partir dos 155 min de cozimento) verificou-se que os valores se mantinham aproximadamente constantes, cerca de 18% do peso inicial da madeira (Tabela 9 e Figura 33).

O licor de cozimento dissolve a maioria das xilanas na fase inicial do cozimento. Verifica-se que as xilanas dissolvidas (determinadas como anidroxilose) aumentam de

4,1% na fase inicial para 5,6% na fase principal e que depois dos 155 min não ocorre mais uma dissolução significativa de xilanas da pasta para o licor negro (Tabela 9).

Tabela 9 – Monossacarídeos dissolvidos ao longo do cozimento, % m/m, madeira a.s. (AA = 17% e IS = 28%). Concentração de xilanas nos licores negros.

Tempo de cozimento, min	Rham	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Total	Concentração de xilanas, (g/L)
100	0,1	0,1	4,1	1,0	1,0	9,8	16,1	10,2
155	0,1	0,3	5,6	1,0	1,5	9,8	18,2	14,0
170	0,1	0,3	5,7	1,0	1,5	9,3	17,9	14,2
200	0,1	0,3	5,6	1,0	1,6	9,8	18,4	14,5

(Resultados obtidos por diferença entre a composição da madeira e a composição das pastas.)

É importante notar a grande quantidade de glucose que se dissolve no licor negro, que pode resultar da dissolução de sacarídeos de celulose ou de glucanas. Verifica-se que os sacarídeos de glucose são a fracção mais abundante do total de sacarídeos que se dissolvem no licor negro (Tabela 9).

Tabela 10 – Composição em monossacarídeos das xilanas precipitadas dos licores negros, % m/m, madeira a.s. (AA = 17% e IS = 28%).

Tempo de cozimento, min	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Total
100	0,0	0,8	0,0	0,1	0,1	1,0
155	0,1	2,7	0,0	0,2	0,3	3,4
170	0,1	2,9	0,0	0,2	0,3	3,6
200	0,0	2,2	0,0	0,2	0,3	2,7

Determinando a composição das xilanas precipitadas, consegue-se ver que as xilanas precipitadas do licor representam quase 20% dos sacarídeos que são removidos da madeira durante a fase principal e cerca de 15% dos sacarídeos do licor negro durante a fase residual do cozimento (Tabela 11). Esta diminuição pode resultar da intensificação das reacções de degradação dos polissacarídeos que se encontram dissolvidos no licor negro (peeling e hidrólise alcalina). Estes resultados vêm confirmar os valores obtidos na literatura para outra folhosa (Bétula), com aproximadamente 23% de xilanas precipitadas

do total de polissacarídeos dissolvidos na fase principal e 15% de xilanas precipitadas na fase final do cozimento (122).

Tabela 11 – Quantidade de xilanas precipitadas do licor. Percentagem mássica dos polissacarídeos totais e da xilose total dissolvidos no licor negro.

% xil. precipitadas (m/m dos polissacarídeos dissolvidos)	% xil precipitada (m/m da xilose dissolvida)
6,3	19,5
18,4	48,2
19,8	50,9
14,6	39,3

Comparando os resultados (Tabela 9-Tabela 11) pode-se ver que enquanto as xilanas dissolvidas são precipitadas em grande extensão (40-50%), as glucanas dissolvidas só são recuperadas numa extensão de aproximadamente 3%. Este resultado mostra que as glucanas são degradadas em grande extensão durante o cozimento e apenas uma pequena fracção é recuperável. Na fase inicial as xilanas recuperáveis por precipitação são apenas cerca de 6% dos sacarídeos do licor (Tabela 11 e Figura 33), o que corresponde a 20% das xilanas dissolvidas no licor. Nesta fase do cozimento as xilanas de menor peso molecular e mais substituídas são dissolvidas mais facilmente, havendo apenas uma pequena fracção passível de se precipitar por acidificação do licor negro.

A Figura 33 resume o comportamento das xilanas e sua dissolução ao longo do cozimento. A Tabela 11 e o gráfico da Figura 33 mostram claramente que a quantidade de xilana precipitada do licor negro (determinada como anidroxilose) na fase principal (155 min) representa aproximadamente 50% da xilana total que é removida da madeira durante o cozimento, diminuindo para 40% na fase residual (200 min).

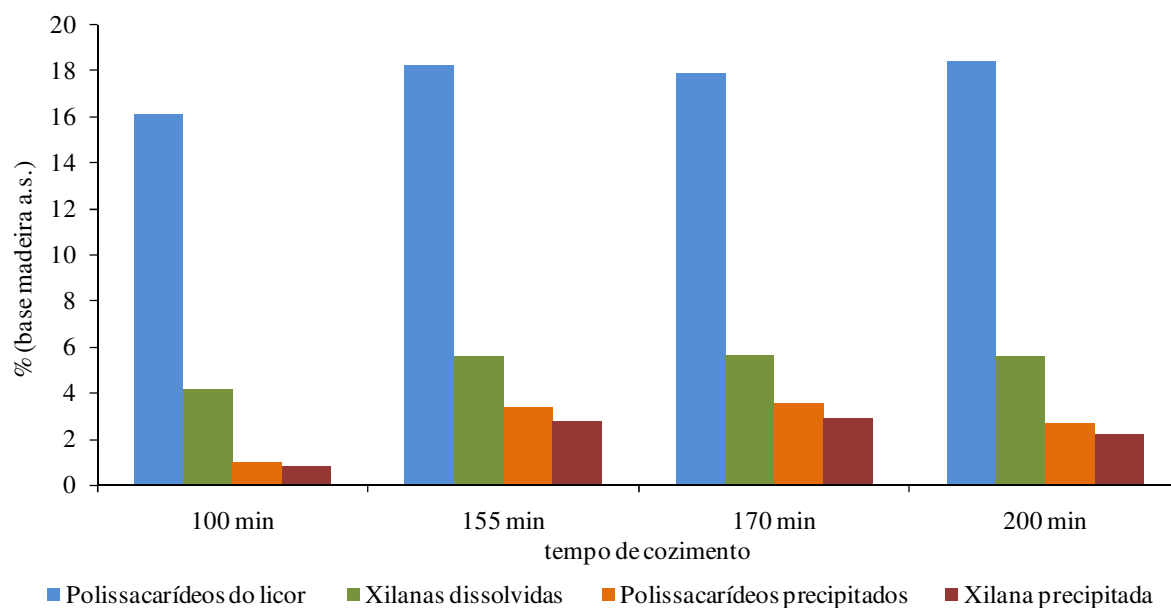


Figura 33 - Balanço total aos polissacarídeos e às xilanas dissolvidas no licor e aos polissacarídeos totais e às xilanas precipitados do licor negro

Desta primeira abordagem ao comportamento das xilanas durante o cozimento kraft, é possível prever que a precipitação destas durante o cozimento pode ocorrer ou ser provocada. Uma grande parte das xilanas que são retiradas da madeira apresentam uma estrutura polimérica adequada à precipitação, visto ser possível recuperar do licor uma grande parte das xilanas dissolvidas (50%). É de se notar também que as glucanas que se dissolvem no licor negro são recuperadas em muito pouca quantidade. Para poder comprovar este facto é importante fazer a caracterização das xilanas do licor negro e tentar entender o seu comportamento ao longo do cozimento.

4.1.2 Caracterização das hemiceluloses ao longo do cozimento

O objectivo principal desta fase do trabalho foi conhecer a natureza polimérica das xilanas dissolvidas no licor de cozimento kraft de *Eucalyptus globulus*, e caracterizar e entender as mudanças estruturais que ocorrem nas xilanas, ao longo do cozimento. Dos vários cozimentos laboratoriais realizados foram analisadas e comparadas as xilanas das pastas e do licor e as extraídas da madeira.

4.1.2.1 Análise da composição em monossacarídeos

A análise aos monossacarídeos das várias amostras de xilanas (da madeira, da pasta e do licor) permite acompanhar a variação das suas composições ao longo do cozimento, ver capítulo 3.4.2 (166, 167). A composição das xilanas da madeira, da pasta, e do licor são diferentes e apresentam uma composição que revela claramente um comportamento próprio durante o cozimento (Tabela 12).

O método escolhido para a precipitação dos polissacarídeos do licor negro é bastante selectivo, resultando numa amostra bastante pura, com um teor de lenhina muito baixa. As composições das xilanas precipitadas apresentaram valores de monossacarídeos neutros de cerca de 80-90%. Note-se que os ácidos urónicos não estão contabilizados nestes valores e que representam cerca de 5-10% da xilana (Tabela 14), apontando para composições em hidratos de carbono superiores a 80-90%.

As xilanas da madeira apresentam teores em glucose e galactose bastante significativos, já referenciado na literatura como glucanas e galactanas (8). Verifica-se que as glucanas são a segunda fracção mais abundante das xilanas precipitadas do licor negro (Tabela 12). Durante o cozimento, as xilanas mais ramificadas e mais ricas nestes açúcares são extraídas para o licor negro mais facilmente, observando-se por isso teores superiores de glucose e galactose. As xilanas menos ricas nestes açúcares (glucose e galactose) permanecem na pasta. É possível observar ainda que a composição, das xilanas extraídas da pasta e as que se dissolveram no licor negro, não sofre grandes alterações ao longo do cozimento. Apenas as xilanas das pastas, obtidas no período de aquecimento do reactor (fase inicial) e mais semelhantes às xilanas da madeira, têm uma composição diferente das outras obtidas mais tardiamente. Estes dados revelam que a dissolução preferencial das xilanas mais ramificadas ocorre logo na fase inicial, confirmado pela quantidade de glucose observada nesta na fase. No entanto, é importante notar que as xilanas precipitadas na fase inicial são uma pequena fracção das xilanas dissolvidas (Tabela 11 e Figura 33).

Tabela 12 - Composição em monossacarídeos (% normalizada) das xilanas precipitadas dos licores negros ou extraídas das pastas e da madeira.

	Tempo de cozimento, min	Rham	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
Xilanas da Madeira		1,0	0,3	87,6	0,5	3,8	6,8
Xilanas da pasta	100	0.1	0.3	91.1	0.1	3.0	5.5
	155	0.1	0.2	97.0	0.0	1.8	0.8
	170	0.1	0.2	97.4	0.0	1.4	0.8
	200	0.1	0.2	97.7	0.0	1.3	0.6
Xilanas precipitadas do licor negro	100	0.5	1.1	82.5	0.9	4.8	10.2
	155	0.2	1.0	82.0	0.4	6.2	10.2
	170	0.2	1.3	82.4	0.5	6.3	9.4
	200	0.1	1.7	81.3	0.5	6.3	10.1

É natural que haja degradação das hemiceluloses durante o cozimento e que a composição dos monossacarídeos seja afectada, mas estes primeiros resultados não mostram uma grande variação nas composições das xilanas.

Embora esteja referenciado que as glucanas e as galactanas estejam ligadas às xilanas do *E. globulus*, é necessário ponderar a hipótese de as glucanas e as galactanas, que se estão a quantificar aqui, possam não estar totalmente ligadas à xilana mas também dissolvidas isoladamente. No entanto, não é esperado que as glucanas e galactanas que se encontram isoladas, se mantivessem até ao fim do cozimento, pois como foi visto nos resultados obtidos no capítulo anterior, apenas 3% das glucanas que se dissolvem no licor são recuperáveis por precipitação. Estas glucanas e galactanas, encontradas nas xilanas precipitadas do licor negro, apresentam também uma relativa estabilidade às condições alcalinas usadas no cozimento e deverão estar maioritariamente ligadas à xilana.

Foi visto que parte das xilanas dissolvidas no licor podem ser precipitadas, o que leva a ponderar a hipótese de as glucanas e as galactanas ligadas à xilana, precipitarem conjuntamente, aumentando também o rendimento da precipitação.

4.1.2.2 Determinação do peso molecular médio

Uma característica importante a determinar nos polissacarídeos é o peso molecular médio. O peso molecular médio é uma medida da integridade dos polissacarídeos. Esta técnica permite obter a distribuição de massas moleculares e o valor médio de massa molecular (165). Neste trabalho, um abaixamento dos pesos moleculares pode resultar da degradação das xilanas ou do isolamento preferencial de xilanas de menor peso molecular.

A técnica que se utilizou para determinar os pesos moleculares médios ponderados (Mw) das xilanas dissolvidas no licor negro e das xilanas extraídas das pastas e da madeira foi a cromatografia de permeação por gel (GPC).

Todos os cromatogramas obtidos apresentam um pico de eluição entre os 14 e os 18 min (Figura 34). O pico das curvas de eluição obtidas é atribuído à xilana, com pesos moleculares médios entre os 15 e os 30 kDa.

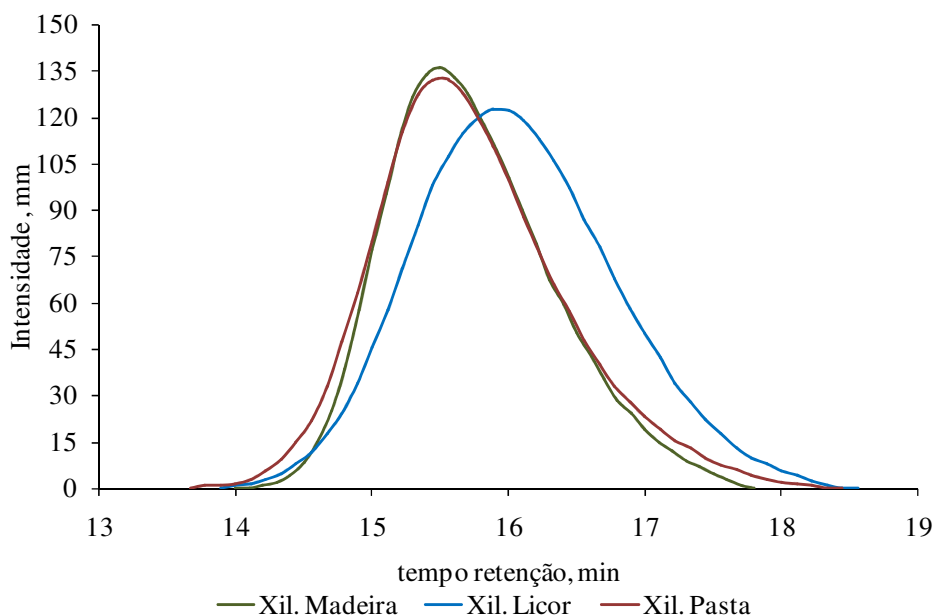


Figura 34 - Curva de eluição de GPC das xilanas extraídas da madeira, da pasta e precipitadas do licor negro para o tempo de cozimento de 200 min.

Na Figura 34 verifica-se que as xilanas extraídas da madeira e da pasta têm picos de eluição muito idênticos, enquanto que as xilanas dissolvidas no licor apresentam um pico mais largo e com tempos de eluição mais tardios. Estes resultados revelam que as xilanas

que se recuperam do licor negro têm pesos moleculares médios mais baixos e uma distribuição de pesos moleculares médios maior.

Da literatura sabe-se que a xilana do *E. globulus* apresenta valores de Mw entre 25600-36300 Da (8, 36, 39). Os valores obtidos aqui para as xilanas da madeira e das pastas estão de acordo com estes valores. A pequena variação que se observa entre a xilana da madeira e das pastas (Tabela 13) mostra que as últimas são bastante estáveis às condições alcalinas do cozimento e que a despolimerização das xilanas se dá principalmente em meio aquoso, no licor negro, sendo menos extensa no estado sólido, na fibra.

No entanto, é necessário lembrar que o processo que se usa na recuperação das xilanas extraídas da madeira e das pastas é por precipitação sob etanol. Este método permite precipitar apenas as xilanas com pesos moleculares a partir de um determinado valor, as xilanas de menor peso molecular não são recuperadas.

Os valores de Mw das xilanas precipitadas do licor negro variam entre 18900 Da, na fase inicial e 17700 Da na fase residual (Tabela 13). Estes valores estão de acordo com os valores que se encontram na literatura para diferentes espécies de madeira de folhosas (33, 181). Estas pequenas variações de Mw resultam essencialmente da elevada estabilidade dos polissacarídeos ao cozimento kraft, especialmente as xilanas do *E. globulus* (8).

Tabela 13 – Pesos moleculares médios das xilanas isoladas das pastas kraft, dos licores negros e da madeira.

Tempo de cozimento, min	Xilana da madeira	Xilanas da pasta	Xilanas do licor negro
0	27700		
100		25000	18900
155		27400	17600
170		27000	18400
200		25500	17700

(Os cálculos do peso molecular médio das xilanas do licor negro usam apenas o pico com tempos de eluição entre 14 e 18 min, característico da xilana)

Quando se compara os valores do Mw das xilanas da madeira e da pasta com os valores do Mw das xilanas dissolvidas no licor negro, verifica-se que as xilanas do licor negro são cerca de 30% mais pequenas (Tabela 13). Este facto pode resultar da despolimerização parcial das xilanas e/ou da dissolução inicial e mais rápida das xilanas de

menor peso molecular. O facto de não existir uma diminuição clara dos valores de Mw da fase inicial para as outras fases pode revelar ainda dois cenários: (1) a despolimerização ocorre essencialmente no início do cozimento e posteriormente ocorre em pequena extensão ou (2) ocorre uma dissolução das moléculas de menor peso molecular na fase inicial, e na fase principal do cozimento, com a temperatura mais elevada, ocorre então uma despolimerização mais acentuada. Ambos os cenários não permitem observar grandes diferenças nos valores de Mw obtidos. No entanto, a segunda hipótese parece ser a mais apropriada, pois a reacção de hidrólise ocorre a temperaturas mais elevadas ($>140^{\circ}\text{C}$), observadas na fase principal do cozimento.

No entanto, e mais uma vez, é importante notar que o método de recuperação das xilanas do licor é o método de precipitação, o que permite recuperar apenas as xilanas de maior peso molecular, deixando as de baixo peso molecular na solução.

Os pesos moleculares médios obtidos mostram que as xilanas apresentam uma estrutura polimérica com alguma estabilidade. As que estão dissolvidas no licor podem ser precipitadas com um peso molecular suficientemente elevado para que estas tenham valor industrial na sua precipitação sobre as fibras.

4.1.2.3 Determinação do teor em ácidos urónicos

É sabido que as xilanas do *E. globulus* têm na sua estrutura grupos de ácidos urónicos nas cadeias laterais, o ácido metilglucurónico (MeGlcA) (8, 36). Durante o cozimento estes grupos são degradados e convertidos no ácido hexenurónico (HexA), que por sua vez, se vai degradando ao longo do cozimento. As xilanas do licor estão bastante mais acessíveis ao ataque alcalino do que as xilanas que permanecem na pasta. Assim é de se esperar uma diminuição no teor de ácidos urónicos com o progredir do cozimento. A determinação do teor de ácidos urónicos vai ajudar a seguir este comportamento durante o cozimento kraft. O teor de ácidos urónicos foi determinado colorimetricamente através do método do m-fenilfenol (168) (ver capítulo 3.4.3).

Durante o cozimento as xilanas do licor perdem cerca de 30-45% dos ácidos urónicos iniciais (Tabela 14). As maiores perdas verificam-se após a temperatura final do cozimento

ser atingida, uma vez que a xilana do licor correspondente à fase inicial do cozimento contém um teor em ácidos urónicos idêntico ao das xilanas extraídas das pastas.

Tabela 14 - Percentagem de ácidos urónicos das xilanas extraídas da pasta e das dissolvidas no licor negro.

% de ácidos urónicos (m/m)		
Tempo de cozimento, min	Xilanas da pasta	Xilanas do licor negro
100	nd	10,0
155	10,3	6,9
170	10,7	5,4
200	10,1	6,2

nd – não determinado

Verifica-se que a perda de ácidos urónicos nas xilanas da pasta, durante o cozimento, não ocorre em tanta extensão como ocorre nas xilanas dissolvidas no licor, devido, possivelmente, à menor acessibilidade que o licor tem às xilanas da pasta (Tabela 14).

Quando comparados com os valores obtidos na literatura para as xilanas da madeira de *E. globulus*, aproximadamente 11% (8, 36), pode-se ver que o teor de ácidos urónicos na xilana do licor, no fim da fase inicial, é ligeiramente inferior. O MeGlcA começa a degradar-se e a consumir-se logo na no início da fase inicial do cozimento (ver capítulo 2.2.1.2.4 e Figura 28), e embora haja alguma conversão do MeGlcA em HexA, existe sempre alguma perda no teor total de ácidos urónicos (105, 109, 110, 112). As xilanas mais substituídas e mais ricas em ácidos urónicos dissolvem-se mais facilmente (114, 117, 123) e como tal as reacções do MeGlcA ocorrem em maior extensão nestas xilanas. Este último dado justifica a diferença que existe no teor de ácidos urónicos obtidos para a xilana da madeira (8, 36) e para as xilanas do licor. No entanto, deverá ter-se em conta que os métodos de isolamento das xilanas usados, aqui e nos trabalhos mencionados (8, 36), foram diferentes e que estes podem influenciar os resultados.

É também notório que a diminuição do teor de ácidos urónicos nas xilanas dissolvidas no licor ao longo do cozimento não é tão acentuada como se esperava. Existe uma diminuição significativa do fim da fase inicial para a fase principal do cozimento, mas a partir dos 155 min não se observa grandes perdas de ácidos urónicos. A literatura já

descreve este comportamento onde se vê uma diminuição bastante lenta do teor de ácidos urónicos para tempos superiores a 140 min (ver capítulo 2.2.1.2.4 e Figura 28) (105, 109).

4.1.2.4 Análise de ligações por metilação

Um dos métodos utilizados na análise estrutural dos monossacarídeos das hemiceluloses isoladas é a análise de ligações por metilação. Este método permite determinar a posição das ligações glicosídicas e a posição dos grupos hidroxilo que estão envolvidas nos polissacarídeos em causa. A metodologia seguida está descrita em (164, 171, 172), ver capítulo 3.4.5.

As principais unidades estruturais observadas são as esperadas: a unidade $\rightarrow 4$)-Xylp-(1 \rightarrow é a maioritária nas xilanas analisadas e corresponde às unidades de xilose da cadeia principal não substituídas, as unidades $\rightarrow 2,4$)-Xylp-(1 \rightarrow , $\rightarrow 3,4$)-Xylp-(1 \rightarrow e $\rightarrow 2,3,4$)-Xylp-(1 \rightarrow que provêm das unidades de xilose ramificadas, e os resíduos metilados de MeGlcA terminal, Glcp A-(1 \rightarrow , e MeGlcA substituído, $\rightarrow 2$)-Glc p A -(1 \rightarrow . O cromatograma obtido para amostra obtida na fase inicial está apresentado na Figura 35.

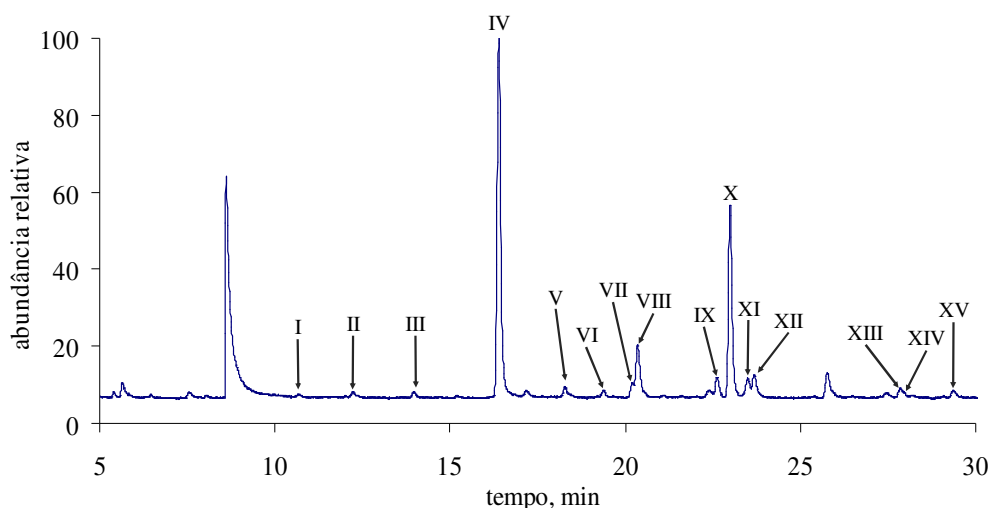


Figura 35 – Cromatograma dos resíduos metilados da xilana precipitada do licor negro (tempo de cozimento de 100)

Com o tempo de cozimento observam-se pequenas variações estruturais, ao nível das ligações das xilanas que são recuperadas do licor. Comparando os cromatogramas das xilanas dissolvidas no licor negro, aos vários tempos de cozimento, verifica-se que os picos referentes aos resíduos de MeGlcA (XII e XIV) vão diminuindo com o decorrer do tempo de cozimento, como resultado da sua degradação. A Tabela 15 mostra também esta variação. É de se notar que a quantidade obtida entre os resíduos de MeGlcA (GlcA-(1→ e →2)-GlcA-(1→) e os resíduos ao qual este se liga na xilana, →2,4)-Xylp-(1→, não ter concordância quantitativa entre eles. Quantificaram-se mais unidades de xilose substituídas na posição 2 do que a soma de unidades de GlcA. Este facto pode resultar da contribuição dos resíduos de HexA, pois este ácido não é detectado por esta técnica e sabe-se que estas xilanas contém uma quantidade significativa deste ácido.

Tabela 15 – Análise por metilação das xilanas precipitadas do licor negro (amostras obtidas aos tempos 100 e 180 min). (D2) – resíduos deuterados.

Resíduos metilados	Unidades estruturais	Razão molar relativa (/100 unidades xil.)	
		100 min	170 min
Xyl-2,3,4	II	Xylp-(1→	1
Xyl-2,3	IV	→4)-Xylp-(1→	80
Xyl-3	VIII	→2,4)-Xylp-(1→	12
Xyl-2	VII	→3,4)-Xylp-(1→	3
Xyl	XI	→2,3,4)-Xylp-(1→	4
Glc-2,3,4 (D2)*	XII	GlcA-(1→	5
Glc-3,4 (D2)*	XIV	→2)-GlcA-(1→	1
Gal-2,3,4,6	VI	Galp-(1→	2
Gal-2,3,6	IX	→4)-Galp-(1→	5
Gal-2,3 ou	XIII	→4,6)-Galp-(1→	2
Glc-2,3		→4,6)-GlcA-(1→	1
Gal-2,4	XV	→3,6)-Galp-(1→	1
Glc-2,3,4,6	V	GlcA-(1→	2
Glc-2,3,6	X	→4)-GlcA-(1→	43
Ara-2,3	III	→5)Ara-(1→	1
Ara-2,3,5	I	Ara-(1→	1

* Resíduos obtidos por redução com LiAlD₄

Na xilana analisada consegue-se identificar também os resíduos de galactopiranosose (VI, IX, XIII e XV) e arabinofuranose (III e I). Estes resíduos estão descritos na literatura e podem ser atribuídos a oligómeros de ramnoarabinogalactana ligados na posição 2 do MeGlcA (8) (Tabela 15). Não foram detectados resíduos de ramnopiranosose.

Esta técnica mostrou ainda a presença de unidades estruturais do tipo $\rightarrow 4$)-D-Glcp-(1 \rightarrow e $\rightarrow 4,6$)-D-Glcp-(1 \rightarrow , típicas das glucanas e do amido (resíduos X e XIII da Figura 35), demonstrando pela primeira vez a presença de grandes quantidades de amilopectinas na madeira de *E. globulus*. Este resultado vem comprovar que a glucose obtida na análise aos monossacarídeos pertence a uma glucana (Tabela 12 e Tabela 15). A diminuição verificada nas razões molares das unidades estruturais das glucanas (resíduos X e XIII) indicam uma degradação das ramificações das xilanas fase principal do cozimento. No entanto, os valores obtidos para os resíduos metilados das unidades de glucose interior ($\rightarrow 4$)-Glcp-(1 \rightarrow) são considerados excessivos e não estão de acordo com os valores obtidos anteriormente na análise aos monossacarídeos (Tabela 12). Estes valores podem resultar de problemas processuais na metilação das amostras, nomeadamente numa dissolução insuficiente das xilanas nos solventes utilizados nesta técnica.

Não se conseguem distinguir os resíduos metilados Gal-2,3 e Glc-2,3 no espectro de massa, localizados ambos na posição XIII. Embora a quantidade de glucose determinada pela análise aos monossacarídeos seja ligeiramente superior à quantidade de galactose (Tabela 12), a diferença entre os teores destes dois açúcares não permite atribuir claramente o pico a um deles. Nesta zona do espectro pode ocorrer a sobreposição dos dois picos, resultando como tal em razões molares relativas inferiores.

Os resíduos metilados e as suas abundâncias, obtidas para esta xilana, são idênticas aos obtidos anteriormente na literatura para a xilana da madeira (8). A análise às ligações por metilação revela que as principais características estruturais das xilanas se mantêm intactas ao longo do cozimento, ocorrendo algumas alterações estruturais principalmente ao nível das ramificações.

4.1.2.5 Espectroscopia de RMN

A análise estrutural das hemiceluloses foi complementada com a espectroscopia de RMN a 1 (^1H RMN e ^{13}C RMN) e 2 dimensões (^1H - ^1H TOCSY e HSQC). A espectroscopia de RMN é bastante usada no estudo estrutural de grande parte dos compostos. Nesta técnica os polissacarídeos são geralmente dissolvidos em água deuterada (D_2O) ou em dimetilsulfóxido deuterado (DMSO). É possível encontrar em alguma literatura alguns espectros de RMN de próton com os picos característicos das xilanas (8, 32, 36, 65, 112, 182). Em alguns casos, a espectroscopia de RMN multidimensional (como TOCSY, HSQC, NOESY e ROESY) permite determinar a estrutura completa dos oligossacarídeos (165).

Os espectros de ^1H RMN permitiram seguir a degradação do MeGlcA e o aparecimento do HexA nas xilanas, assim como identificar os principais elementos estruturais das xilanas da pasta e do licor.

A análise da região anomérica do espectro de ^1H RMN mostra o aparecimento de picos novos, a 5.36 e a 5.82 ppm, tanto nas xilanas da pasta como nas xilanas do licor negro. Estes picos estão normalmente atribuídos ao H-1-HexA e ao H-4-HexA (112) (Figura 36).

Com o progredir do tempo de cozimento, verifica-se que ao mesmo tempo que existe o aumento da intensidade dos picos referentes ao HexA, há uma diminuição gradual dos picos atribuídos ao H-1 do MeGlcA, a 5,29 ppm, indicando assim a degradação do MeGlcA e a sua transformação em HexA (8, 36, 183) (Figura 36).

É possível observar também que o pico referente ao MeGlcA substituído na posição 2 (MeGlcA \rightarrow 2-Hex) a 5,42-5,44 ppm vai diminuindo de intensidade com o progredir do cozimento, como resultado da degradação das cadeias laterais e/ou da sua conversão em HexA. No entanto, este pico não chega a desaparecer completamente, comprovando que a ligação que se estabelece entre o MeGlcA os oligossacarídeos que lhe estão ligados apresenta alguma estabilidade. Estes dados vêm comprovar a especificidade da xilana do *E. globulus* que apresenta cadeias laterais de glucanas e galactanas, já mencionados na literatura (8) (Figura 36).

Verificou-se uma diferença significativa entre as xilanas da pasta e as xilanas do licor negro. Observou-se o aparecimento de um pico nos espectros das xilanas do licor negro a

5,41 ppm (nas imediações da zona de ressonância de 5,42-5,44 ppm referente ao H-1 das unidades de MeGlcA ramificadas pela posição *O*-2 com D-Galp ou D-Glcp (MeGlcA→2-Hex)). Este pico, embora bastante fraco nos espectros das xilanas da pasta, é bastante forte nos espectros das xilanas do licor, prevalecendo em relação a outros prótons anoméricos (Figura 36).

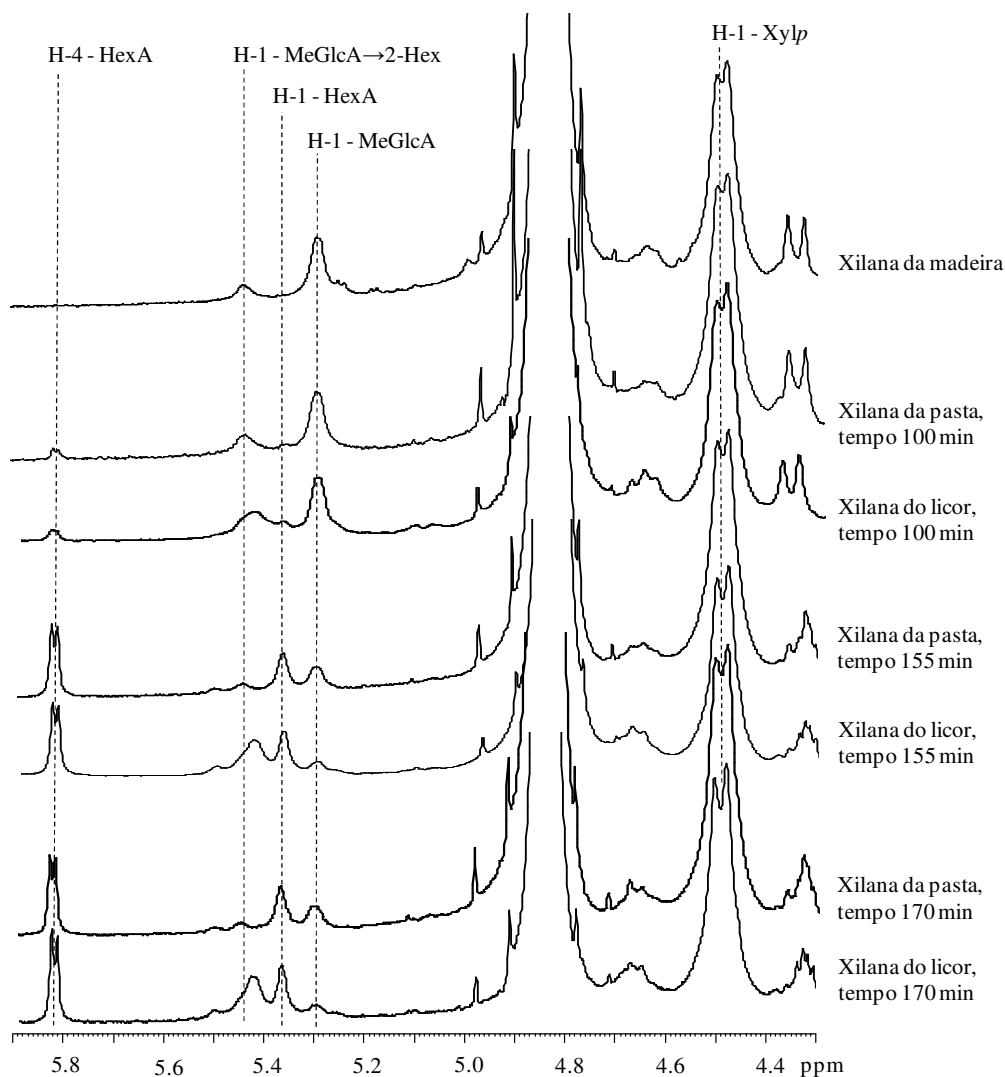
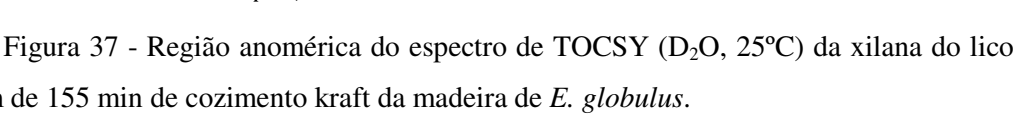


Figura 36 - Espectro de ^1H RMN das xilanas extraída da madeira, das pasta e das xilanas precipitadas do licor ao fim de 100, 155 min e 170 min de cozimento da madeira de *E. globulus*.

Da análise aos espectros de RMN a duas dimensões (TOCSY) das xilanas do licor não foi possível observar as correlações típicas entre prótons H-4 (3,27 ppm), H-2 (3,77 ppm) e H-3 (3,87 ppm) do MeGlcA→2-Hex. De igual modo, as correlações entre ^1H - ^{13}C por HSQC, esperados a 83,1 (C-4), a 75,9 (C-2) e a 73,6 (C-3) também não foram detectados (Figura

IV VII, VIII



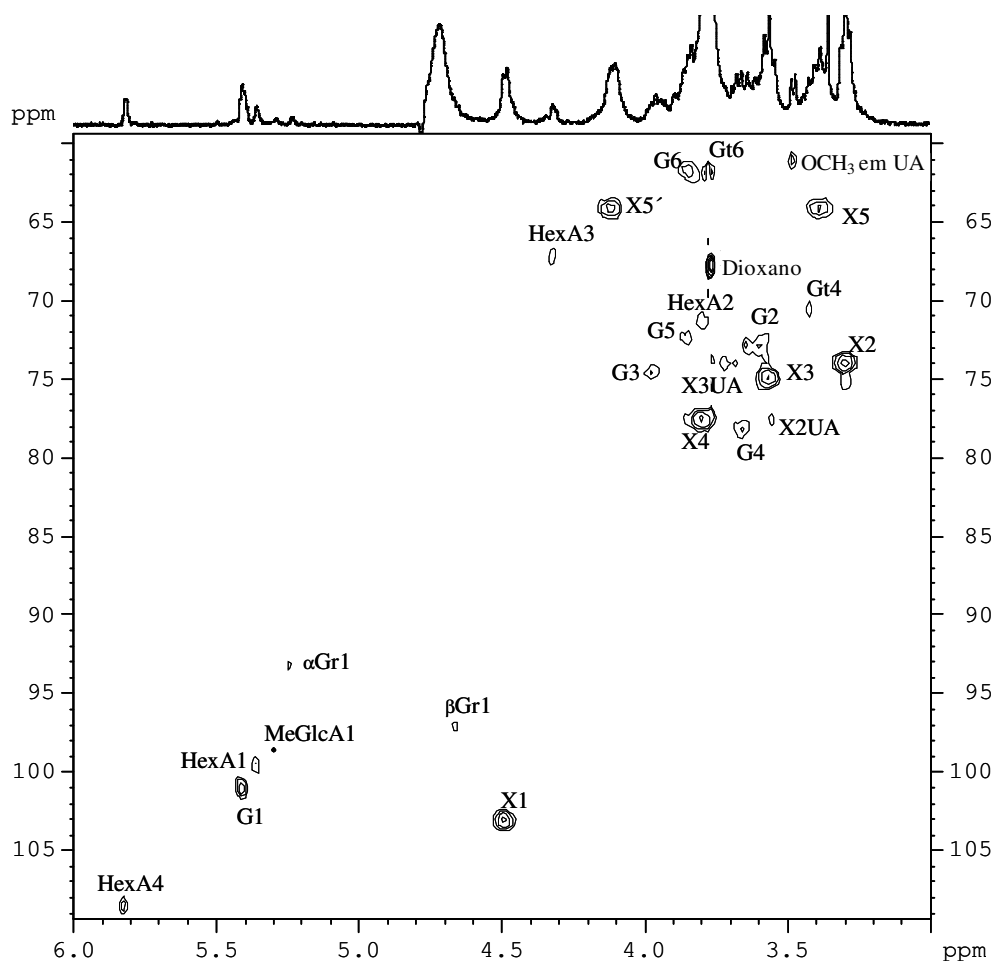


Figura 38 - Espectro de HSQC (D_2O , $25^\circ C$) das xilanas do licor negro ao fim de 155 min de cozimento kraft da madeira de *E. globulus*. As designações utilizadas são: X, unidade de Xylp interna na cadeia principal da heteroxilana; XUA, unidade de Xilp interna ligada em O-2 com uma unidade de ácido urónico (MeGlcA, MeGlcA-Hex ou HexA); G, unidade de β -(1 \rightarrow 4)-D-Glcp interna na cadeia principal de D-glucana; α Gr e β Gr, α - e β -isómeros, respectivamente, no terminal redutor da unidade D-Glcp; Gt, terminal não-redutor da unidade α -D-Glcp.

É interessante ver nestes resultados que a glucana que se encontra nas xilanas do licor negro não se encontra nas xilanas da pasta, concordando com os resultados obtidos na análise aos monossacarídeos (Tabela 12). A dissolução preferencial das xilanas mais ramificadas e ricas em glucose justifica esta diferença.

O espectro de RMN permitiu ainda estimar as quantidades dos diferentes grupos urónico nas xilanas das pastas e das xilanas dissolvidas nos vários licores negros (Tabela 16).

Tabela 16 – Quantificação dos H-1 dos ácidos urónicos nas xilanas das pastas e dos licores negros (nº de unidades por 100 unidades de Xylp)

	Tempo de cozimento, min	MeGlcA	MeGlcA→2-Hex	HexA
Xilanas da pasta	100	18	8	4
	155	8	4	8
	170	7	3	9
	200	6	3	9
Xilanas precipitadas do licor negro	100	18	6	4
	155	4	1	11
	170	3	<1	11
	200	3	<1	10

A frequência dos diferentes grupos substituintes de ácidos urónicos (MeGlcA, MeGlcA→2-Hex e HexA) na cadeia principal foi calculada para 100 prótons anoméricos das unidades interiores de Xylp (Tabela 16). Verificou-se que na fase inicial do cozimento as abundâncias são idênticas em ambas as xilanas (licor e pasta). No entanto nas fases principal e residual do cozimento verificou-se uma conversão relativamente mais elevada do MeGlcA em HexA nas xilanas do licor negro que nas xilanas da pasta. Na fase inicial observou-se a dissolução de uma fracção de xilanas bastante ramificadas (Tabela 16), muito provavelmente de baixo peso molecular. Na fase principal e residual do cozimento, embora se observe alguma degradação do MeGlcA substituído, uma fracção significativa deste ácido substituído permanece na xilana da pasta. Este resultado demonstra a estabilidade relativamente elevada da ligação do MeGlcA aos outros polissacarídeos (glucanas e ramnoarabinogalactanas) nesta xilana. A degradação total de ácidos urónicos ao longo do cozimento ocorre em ambas as xilanas (da pasta e do licor), embora nas xilanas da pasta seja menos acentuada. Nas fases principal e residual o teor de ácidos urónico em ambas as xilanas mantém-se aproximadamente constante. A degradação que se observa nas xilanas do licor negro é mais notória e confirma os resultados obtidos anteriormente na determinação do teor de ácidos urónico, no capítulo 4.1.2.3.

As xilanas obtidas nas várias extracções efectuadas (à pasta, ao licor e à madeira) confirmam que as xilanas da madeira de *Eucalyptus globulus* são bastantes complexas, apresentando quantidades significativas de glucanas e de galactanas. As xilanas que se

dissolvem no licor negro são ricas em ácidos urónicos e mantêm a sua cadeia polimérica e as suas características estruturais principais. As xilanas que se dissolvem no licor negro, embora apresentem uma diminuição no peso molecular médio (face às que permanecem na pasta), podem ainda assim ser recuperadas e precipitadas do licor negro sobre a pasta kraft. A precipitação das xilanas resulta na precipitação conjunta das glucanas, podendo aumentar o rendimento final em pasta.

4.1.3 Comportamento das hemiceluloses com a alteração das condições alcalinas do cozimento kraft

As xilanas do licor negro e das pastas apresentam determinadas características dependendo, naturalmente, das condições de cozimento utilizadas. Estas condições podem fazer-se reflectir na capacidade de se recuperar e precipitar as xilanas que se dissolveram no licor. O objectivo do estudo do comportamento das hemiceluloses no cozimento kraft com a alteração das condições alcalinas é perceber como é que a alcalinidade actua nas composições e estrutura polimérica das xilanas da pasta e do licor e como é que influencia a recuperação e precipitação das xilanas do licor.

Para este estudo realizaram-se vários cozimentos com variação das condições de alcalinidade do cozimento. Para tal, foram precipitadas as xilanas do licor negro e extraídas as xilanas das pastas resultantes dos cozimentos às várias alcalinidades.

As condições do cozimento usadas foram: alcalis activos - 12%, 14%, 15% e 17%; índice de sulfureto – 28% e tempo de patamar a 160°C – 80 min.

A contribuição da lenhina nas pastas produzidas foi estimada através da Equação 16, descrita na literatura (39).

$$\% \text{ lenhina} = IK \times 0,187 - 0,75$$

Equação 16

A quantidade de pasta produzida nestes cozimentos varia naturalmente com a alcalinidade. Para valores de alcalinidade mais baixos a deslenhificação não é tão acentuada e a quantidade de incozidos é superior, não se produzindo tanta pasta. O cozimento com alcalinidades mais baixas resulta também em licores de cozimento

diferentes, a dissolução das xilanas vai ser menor, e como tal a quantidade de xilanas possível de recuperar e precipitar será inferior. A Tabela 17 descreve a quantidade de pasta produzida e o índice kappa (IK) obtido para cada uma delas.

Tabela 17 – Rendimento em pasta dos cozimentos e respectivo IK (m/m de madeira a.s.).

Alcali activo, %	Rendimento, %	IK
12	52,1	20,2
14	53,6	13,4
15	53,9	13
17	53,0	12,8

(rendimentos calculados sem lenhina e desprezando os extractáveis e cinzas)

Verificou-se que para valores de alcalinidade mais baixas obtiveram-se quantidades de pasta menores e pastas mais ricas em lenhina.

A Tabela 18 resume os resultados da extracção das xilanas das pastas. O cálculo da quantidade de xilana extraída em base madeira a.s. foi realizado tendo em conta o rendimento de extracção e a quantidade de pasta produzida sem lenhina (Tabela 17).

Tabela 18 – Rendimento da extracção das xilanas das pastas e quantidade de xilana extraída das pastas, em base madeira a. s., nos vários cozimentos.

Alcali activo, %	Rendimento da extracção, %	Xilana extraída, % (m/m)
12	22,8	12,3
14	16,9	9,2
15	17,9	9,8
17	16,1	8,7

Como se esperava, a pasta resultante do cozimento com 12% de alcalinidade apresentou um rendimento de extracção (~23%) e uma quantidade de xilanas extraídas (12,3%) superiores, pois a alcalinidades mais baixas a degradação e dissolução dos constituintes da madeira é menos acentuada. Nos cozimentos com alcali activo de 14%, 15% e 17% não se observaram variações muito significativas no rendimento de extracção e na quantidade de xilana extraída. Verificou-se um ligeiro decréscimo no rendimento de extracção (16,1%) e na quantidade de xilana extraída (8,7%) quando se passou para a pasta

resultante do cozimento com alcali activo de 17%. Para alcalinidades mais elevadas existe uma maior degradação de xilanas e uma maior dissolução destas no licor.

A quantidade de xilanas recuperadas e precipitadas do licor varia naturalmente com a alcalinidade (Tabela 19). Neste caso é de se esperar o comportamento inverso em relação às xilanas da pasta.

Tabela 19 - Percentagem de xilanas precipitadas do licor negro em base madeira a. s. nos vários cozimentos.

Alcali activo, %	Xilanas precipitadas, % (m/m)
12	1,9
14	2,3
15	2,3
17	2,7

A quantidade de xilana precipitada do licor negro aumenta com o aumento da alcalinidade do licor de cozimento. Este aumento deve-se essencialmente à maior facilidade de dissolução das xilanas a alcalinidades mais elevadas. Embora as xilanas sejam removidas das pastas, não significa que estas sejam degradadas em grande escala, visto ser possível precipitá-las em grande quantidade, mesmo quando se usam alcalinidades mais elevadas. Este resultado vem confirmar os resultados anteriores em que se viu que estruturalmente as xilanas se mantinham pouco degradadas (capítulo 1.1).

Sendo estas xilanas possíveis de recuperar, é importante entender a influência da alcalinidade na sua composição. Para tal fez-se uma caracterização sumária das xilanas da pasta e do licor.

4.1.3.1 Análise da composição em monossacarídeos

As xilanas precipitadas do licor foram quantificadas e analisadas quanto à sua composição em monossacarídeos. A Tabela 20 descreve a composição dessas xilanas com o aumento da alcalinidade do licor do cozimento. Os resultados da Tabela 20 vão de encontro aos obtidos na Tabela 10.

Verificou-se que o teor de xilose nas xilanas do licor aumenta com a alcalinidade. Este facto resulta principalmente da maior dissolução das xilanas no licor e do maior grau de degradação das cadeias laterais compostas essencialmente por glucose e galactose (Tabela 20).

Tabela 20 - Composição das xilanas precipitadas do licor negro e das xilanas extraídas da pasta (% normalizada)

Xilanas do licor negro			
Alcali activo, %	Xilose	Galactose	Glucose
12	76,8	10,5	12,6
14	80,8	7,9	11,4
15	83,4	7,0	9,6
17	85,4	5,6	9,0
Xilanas da pasta			
12	96,3	2,4	0,7
14	97,3	1,7	0,6
15	97,4	1,6	0,6
17	98,0	1,2	0,6

Pelas Tabela 19 e Tabela 20 observou-se que a quantidade de xilose, em massa, nas xilanas da pasta se manteve aproximadamente constante com o aumento de alcalinidade (excepto para a pasta resultante do cozimento com alcalinidade de 12% que é aproximadamente 29% mais elevada). A glucose apresentou o mesmo comportamento que a xilose. É natural que a xilana da pasta, resultante do cozimento de menor alcali activo, apresente maiores quantidades dos vários açúcares.

Os polissacarídeos compostos por glucose e galactose, embora se encontrassem em pouca quantidade (<0,3 g) representaram ainda assim uma parte importante da composição das xilanas do licor (15-23%). Com o aumento da alcalinidade observou-se uma diminuição do teor de glucose e galactose, devido à maior quantidade de xilanas dissolvidas e também às reacções de degradação a que estes oligómeros estão sujeitos. As xilanas mais ramificadas são dissolvidas mais facilmente e serão estas as que se obtém a alcalinidades mais baixas, obtendo-se naturalmente valores de glucose e galactose mais

elevados. Para alcalinidades mais elevadas, ocorrem as reacções de degradação nas cadeias laterais mas também a dissolução das xilanas menos ramificadas e mais difíceis de se dissolver, obtendo-se teores de glucose e galactose mais baixos. É de se notar que embora o teor de glucose tenha diminuído com o aumento da alcalinidade, a sua quantidade em massa variou muito pouco (0,22-0,24g/100g de madeira) (Tabela 19 e Tabela 20).

Estes resultados mostraram que, ao tempo de cozimento utilizado (80 min), os polissacarídeos constituídos por glucose e galactose apresentam alguma estabilidade com o aumento da alcalinidade, demonstrando que as xilanas mantêm as suas ramificações até em condições de cozimento mais drásticas.

O comportamento observado para as xilanas da pasta é idêntico ao comportamento observado para as xilanas dissolvidas no licor e precipitadas. A influência que o alcali activo exerce sobre as xilanas é igual para ambas as xilanas, embora as xilanas do licor apresentem menor teor de xilose (77-85%) e consequentemente maior teor de glucose e galactose (9-13% e 6-11%).

Verificou-se mais uma vez, que as xilanas que permaneceram na pasta, durante o cozimento, são pouco ricas em glucose e galactose e as recuperadas do licor negro, pelo contrário, apresentam maiores teores de glucose e galactose.

A quantidade de xilanas precipitadas, mesmo usando condições de cozimento mais drásticas mantém-se relativamente elevada. Estes últimos dados confirmam a possibilidade de a glucose e as galactanas pertencerem às ramificações da xilana e de estas apresentarem uma estabilidade relativa mesmo durante condições de cozimento mais alcalinas.

4.1.3.2 Determinação do peso molecular médio

Na caracterização sumaria das xilanas das pastas e dos licores negros foram determinados também os seus pesos moleculares médios. O objectivo era ver até que ponto a alcalinidade influenciava o peso molecular das xilanas. Como já se viu anteriormente as xilanas do licor apresentam uma diminuição de cerca de 30% face às xilanas da pasta correspondente. Esta tendência manteve-se, com as xilanas do licor a apresentarem pesos moleculares médios 20-40% menores que as xilanas das pastas (Tabela 21). Estes valores

resultam muito provavelmente da dissolução preferencial das xilanas de menor peso molecular e das reacções de degradação que o meio alcalino provoca.

Tabela 21 - Pesos moleculares médios das xilanas extraídas da madeira e da pasta e precipitadas dos licores negros.

Alcali activo, %	Madeira	Pastas kraft	Licores negros
	27700		
12		27800	18900
14		24300	16100
15		26000	16300
17		25500	17700

Para as xilanas obtidas às alcalinidades mais elevadas conseguiu-se observar uma ligeira diminuição no valor do peso molecular médio, originada possivelmente pela maior extensão das reacções de degradação a que estes polissacarídeos estão sujeitos. Os valores determinados no entanto, não mostraram um comportamento claro, podendo-se considerar que o peso molecular médio se mantém aproximadamente constante com o aumento da alcalinidade. O valor ligeiramente superior, obtido com a alcalinidade de 17% (Tabela 21), pode resultar da maior facilidade de dissolução de xilanas de maior peso molecular com o uso de alcalinidades mais elevadas.

O comportamento observado para o peso molecular médio das xilanas que permaneceram nas pastas mostra, claramente, que não há uma degradação muito acentuada com o aumento da alcalinidade, visto estas terem um peso molecular idêntico ao da madeira. Pode-se ver que as xilanas das pastas obtidas com a alcalinidade 12% não revelam qualquer diferença no peso molecular face às xilanas da madeira (Tabela 21), resultado principalmente da baixa alcalinidade e da pouca eficiência do cozimento.

Estes resultados de caracterização mostraram que as xilanas dissolvidas do licor, mesmo usando condições mais drásticas de cozimento, podem ser recuperadas e precipitadas pois mantêm as suas características principais e um peso molecular relativamente alto.

4.1.4 Conclusões

Os polissacarídeos de *E. globulus* dissolvem-se no licor majoritariamente na fase inicial do cozimento, atingindo um valor máximo aproximado de 18% do peso inicial da madeira no início da fase principal. Após se atingir este máximo a percentagem de polissacarídeos dissolvidos no licor mantém-se aproximadamente constante até ao final do cozimento. Verifica-se que grande parte das xilanas removidas durante o cozimento é precipitável. Na fase principal as xilanas precipitadas representam 20% do total de sacarídeos removidos da madeira e na fase residual cerca de 14 %, correspondendo a 50% e a 40%, respectivamente, do total de xilana removida da madeira e dissolvida no licor negro.

As xilanas precipitadas do licor e as xilanas remanescentes na pasta apresentam uma relativa estabilidade às condições do cozimento. A constância nos resultados obtidos na fase principal no teor de ácidos urónicos, no peso molecular médio e na composição em monossacarídeos comprovam esta estabilidade. As xilanas obtidas na fase inicial do cozimento têm uma composição diferente das outras obtidas posteriormente, revelando que as alterações estruturais e a dissolução das xilanas mais ricas em glucose e galactose ocorrem no início da fase principal.

As xilanas da madeira, da pasta, e do licor apresentam composições diferentes, revelando claramente comportamentos próprios durante o cozimento. As xilanas precipitadas do licor são bastante mais ricas em galactose e glucose (proveniente das galactanas e glucanas) que as xilanas da pasta, resultado da maior facilidade de dissolução destes polissacarídeos e das xilanas mais ramificadas no licor de cozimento. Pela análise de monossacarídeos verificou-se que estes polissacarídeos, que estão presentes principalmente nas xilanas do licor negro, apresentam também uma relativa estabilidade às condições alcalinas usadas no cozimento. Dos resultados obtidos até aqui não é possível concluir inequivocamente se as glucanas e as galactanas precipitadas estão todas ligadas à xilana, fazendo parte das suas ramificações, ou se pelo contrário, são polissacarídeos independentes que precipitam simultaneamente. No entanto, os resultados apontam para que grande parte das glucanas e das galactanas estejam ligados às xilanas.

As xilanas dissolvidas do licor negro e recuperadas por precipitação apresentam pesos moleculares médios cerca de 30% menores que os obtidos para as xilanas da pastas

correspondentes. Estes valores resultam essencialmente da maior facilidade de dissolução das xilanas de menor peso molecular no início do cozimento e das reacções degradativas a que as xilanas dissolvidas no licor estão sujeitas na fase principal do cozimento. Os valores de peso molecular médio obtido para as xilanas da pasta e para as xilanas da madeira são semelhantes, indicando que a degradação das xilanas é mais intensa em meio aquoso, no seio do licor negro, que em estado sólido, na fibra.

A caracterização estrutural feita por RMN e análise às ligações por metilação mostra que o tempo de cozimento não traz grandes variações estruturais, ao nível das ligações existentes nas xilanas que são recuperadas do licor. Encontraram-se as unidades estruturais principais das xilanas, nomeadamente: unidades de Xylp na cadeia principal unidas por ligações $\beta(1\rightarrow4)$ ($\rightarrow4$)-Xylp-($1\rightarrow$), unidades de Xyl substituída em O2 e/ou O3 ($\rightarrow2,4$)-Xylp-($1\rightarrow$, $\rightarrow3,4$)-Xylp-($1\rightarrow$ e $\rightarrow2,3,4$)-Xylp-($1\rightarrow$), unidades de MeGlcA terminal (GlcA-($1\rightarrow$) e unidades de MeGlcA substituído em O2 ($\rightarrow2$)-GlcA-($1\rightarrow$). A presença de unidades de MeGlcA substituído em O2 aponta para que as glucanas e as galactanas estejam efectivamente ligadas à xilana.

As alterações estruturais ocorrem essencialmente nas cadeias laterais das xilanas, tendo-se seguido a degradação do MeGlcA e formação do HexA ao longo do cozimento, tanto nas xilanas dissolvidas no licor negro como nas xilanas extraídas da pasta. Nas fases principal e residual do cozimento a conversão do MeGlcA em HexA é relativamente mais elevada nas xilanas do licor negro que nas xilanas da pasta.

Foram identificadas também unidades pertencentes às galactanas e ainda a presença de unidades estruturais típicas das β -glucanas e do amido ($\rightarrow4$)-D-Glcp-($1\rightarrow$ e $\rightarrow4,6$)-D-Glcp-($1\rightarrow$). Demonstrou-se pela primeira vez a presença de grandes quantidades de amido (α -glucanas) na madeira de *E. globulus*, sendo as α -glucanas a segunda fracção mais abundante dos polissacarídeos precipitados.

As xilanas do licor e da pasta apresentam ainda composições diferentes com a alteração da alcalinidade do licor de cozimento, embora os seus comportamentos face a esta variável sejam idênticos. O teor de glucose e de galactose das xilanas precipitadas do licor negro e das xilanas extraídas da pasta diminui com o aumento da alcalinidade, resultado da maior extensão das reacções de degradação a que estes polissacarídeos estão sujeitos. No entanto, esta variação não é tão acentuada nas xilanas das pastas como nas xilanas do licor. As xilanas preservam, ainda assim, parte das suas ramificações,

evidenciando alguma estabilidade das glucanas e galactanas ao aumento da alcalinidade. A análise dos pesos moleculares médios destas xilanas mostra ainda que as reacções de degradação da cadeia principal não ocorrem em grande extensão, e evidenciam a dissolução imediata das xilanas de menor peso molecular para alcalinidades mais baixas e uma degradação pouco acentuada para alcalinidades superiores.

Os resultados de caracterização e comportamento das xilanas durante o cozimento demonstram que as xilanas podem ser potencialmente recuperadas e precipitadas do licor negro com características estruturais não muito alteradas, podendo aumentar o rendimento final em pasta kraft numa situação industrial.

4.2 GLUCANAS E GLUCOMANANAS DA MADEIRA E DA PASTA

Na caracterização das hemiceluloses ao longo do cozimento foram detectadas quantidades significativas de α -glucose nas xilanas precipitadas do licor negro, um monossacarídeo característico do amido (ver capítulo 4.1.2). Pela análise por metilação às ligações realizada às xilanas dissolvidas no licor foram identificadas as unidades típicas das glucanas ($\rightarrow 4$)-D-Glcp-(1 \rightarrow e $\rightarrow 4,6$)-D-Glcp-(1 \rightarrow) (ver capítulo 4.1.2.4 e Tabela 15), resultados estes que foram também confirmados pela espectroscopia de RMN (Figura 36, Figura 37 e Figura 38). A presença de glucanas na forma de amido foi também confirmada pela adição de uma solução de iodo às amostras de xilanas do licor negro, previamente dissolvidas em água, e pelo aparecimento da cor azul-violeta típica do complexo amido-iodo que se forma.

A presença de quantidades significativas de amido pode explicar os altos teores de glucose na análise de açúcares das xilanas precipitadas do licor negro (Tabela 12).

Uma vez que a existência de α -glucose não foi, ainda, claramente provada, e o seu comportamento durante o cozimento, especialmente no *E. globulus*, bem compreendido, este capítulo tem como objectivos principais fornecer alguma informação sobre a forma como as glucanas se encontram na madeira de *E. globulus*, caracterizando-as química e estruturalmente, e ajudar a compreender o seu comportamento durante o cozimento kraft.

4.2.1 Perfil de extracção das glucanas e de outros polissacarídeos ao longo do cozimento

Esta parte do trabalho tem como objectivos compreender como é que as glucanas se comportam ao longo do cozimento alcalino e tentar quantificar a quantidade de amido e de glucomananas na madeira. Para estimar a quantidade e compreender o comportamento das diferentes glucanas durante o cozimento foram realizadas várias extracções a diferentes tempos (10, 30, 60, 90, 120 e 150 minutos), a diferentes temperaturas (90 e 120°C) e usando H₂O e NaOH_{aq} (0,5M) como soluções de extracção (ver procedimento no capítulo 3.3.2). A quantidade extraída, em massa, foi determinada gravimetricamente, através da diferença em madeira seca antes e após a reacção.

A extracção com H_2O a 90°C não foi eficiente, não apresentando um comportamento relevante e coerente. Os perfis de extracção às outras condições escolhidas estão apresentados na Figura 39. Observou-se que a extracção com H_2O , a 120°C , não permitiu uma extracção muito exaustiva, mesmo prolongando o tempo de extracção. A extracção de quase 2% da madeira em massa ocorre logo para tempos curtos, sem que haja perdas posteriores. Este resultado mostrou que a dissolução de algumas glucanas se dá rapidamente e sem necessidade de condições de cozimento muito drásticas. A extracção com H_2O pode ser usada no isolamento de glucanas, com o objectivo de as caracterizar, mas não é apropriada para a determinação quantitativa destas na madeira.

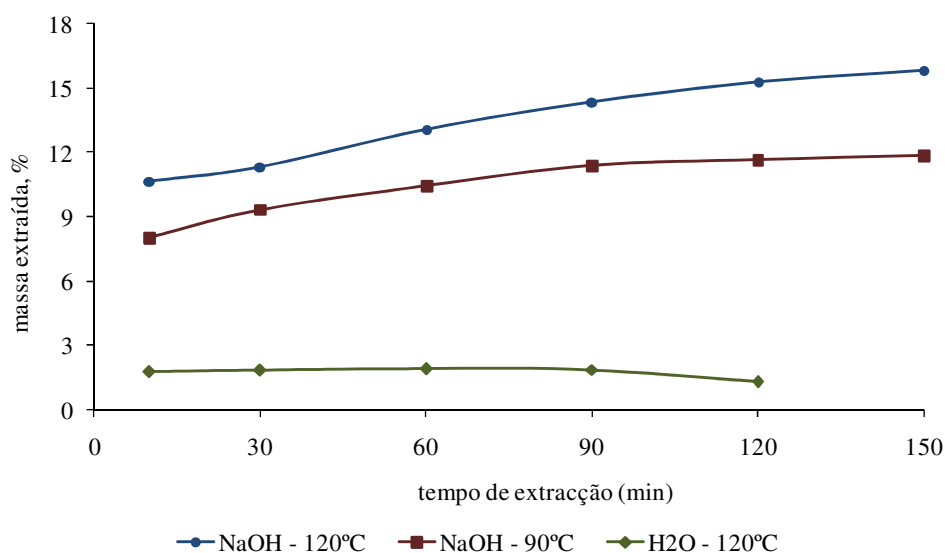
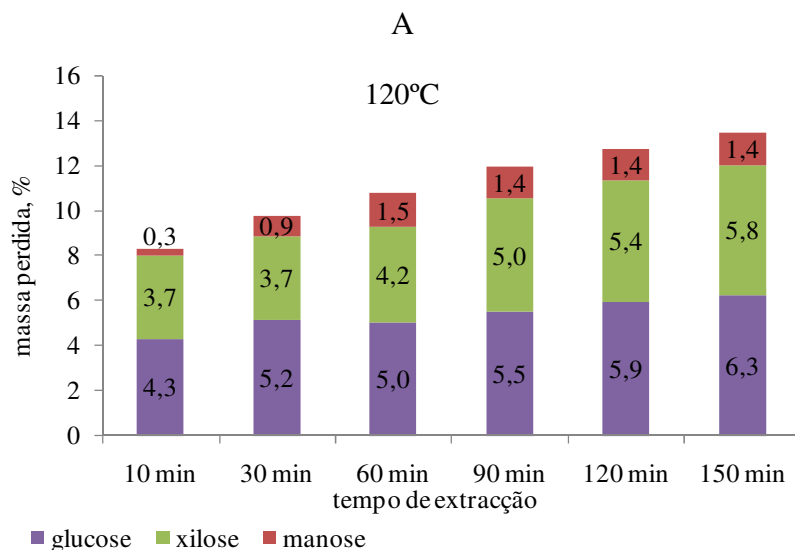
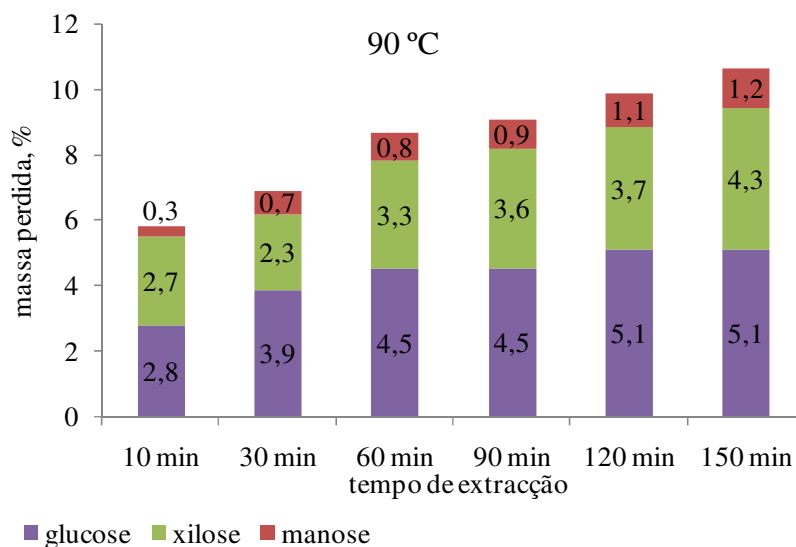


Figura 39 – Percentagem de massa extraída com a solução alcalina de NaOH, 0,5M e a 90°C e 120°C

A utilização da solução alcalina mostrou-se ser mais eficiente, tendo extraído quantidades significativas de glucanas. A quantidade de material extraído, usando uma solução alcalina, aumentou naturalmente com o tempo e com a temperatura (Figura 39). A extracção alcalina removeu, além das glucanas, lenhina, taninos, xilanas e outros polissacarídeos.

Resultados e discussão



B

Figura 40 – Perfil de extração dos polissacarídeos da madeira de *E. globulus* com NaOH 0.5 M a 90°C (A) e 120°C (B).

Fez-se uma análise de açúcares às amostras de madeira de forma a entender quais os polissacarídeos perdidos a cada instante (Figura 40). Verificou-se que depois de uma primeira extração, a 120°C, a percentagem mássica de glucose retirada à madeira permanece aproximadamente constante, por volta dos 5-6%. Como seria de esperar, a 90°C esta estabilização ocorre a tempos superiores. No entanto, independentemente da temperatura, ocorreu a extração de quase 5% ao fim da primeira hora. A 120°C, e a tempos mais longos, pode ocorrer também alguma degradação da celulose, aumentando

um pouco a quantidade de glucose extraída, assim o valor de glucanas obtido para tempos superiores pode estar sobrestimado (Figura 40).

A temperatura apresenta uma grande influência na extracção de xilana (estimada como anidroxilose), pois a 120°C há uma grande extracção inicial e uma relativa constância na extracção a tempos mais longos. As quantidades extraídas mais tarde são pequenas, concordando com muitos dos resultados obtidos aqui e na literatura (7) (Figura 40).

Também é conhecido da literatura que as folhosas têm alguma quantidade de glucomananas na sua constituição (2-5%) (24, 31), e como se verificou (ver capítulo 2.1.2.2) consistem numa cadeia de glucose e manose ligadas entre si por ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4) com razões compreendidas entre 1:1 e 2,3:1 (man:glu) (31). Por dados obtidos no laboratório e não publicados verificou-se que a razão Man:Glc nas glucomananas no *E. globulus* é de 1,3:1. Entrando com o valor da quantidade de manose e esta razão de Man:Glc determinou-se o valor aproximado de glucomananas de 2,5% na madeira. A quantidade de glucanas estimada na madeira de *E. globulus*, depois de fazer a correcção referente à glucomanana, é de cerca de 4-4,5%.

Estes resultados vêm mostrar, e confirmar os resultados obtidos anteriormente, que a segunda hemicelulose mais abundante na madeira de *E. globulus* é uma glucana e que as glucanas são extraídas para o licor de cozimento durante a fase inicial do cozimento.

4.2.2 Quantificação do teor de amilose e amilopectina

O amido é constituído normalmente por dois componentes (amilose e amilopectina) e, dependendo da espécie da árvore, pode-se observar diferentes composições no teor destes constituintes. Uma vez que se observou amido na madeira de *E. globulus*, é necessário perceber como é a sua composição em relação à amilose e à amilopectina. Assim, o objectivo desta parte do trabalho é caracterizar o amido quanto à sua composição em amilose e amilopectina.

A determinação da quantidade de amilose e amilopectina na madeira foi feita por espectrofotometria, utilizando o iodo e as cores características dos complexos coloridos de iodo-amilose (azul-arroxado) e iodo-amilopectina (violeta). Para tal foi determinado o

coeficiente de absorção destes complexos e calculadas as quantidades de iodo a adicionar de modo a que todo o amido da solução a analisar estivesse complexado (174, 186).

Para determinar a quantidade de solução de iodo a utilizar, preparou-se uma solução iodo com as seguintes concentrações: 2 mg de I_2 + 20 mg de KI / ml de água (175). Para cada ponto foi determinado o comprimento de onda (λ) ao qual a absorção é máxima, e foi esse valor que foi contabilizado na determinação da quantidade de solução de iodo a utilizar.

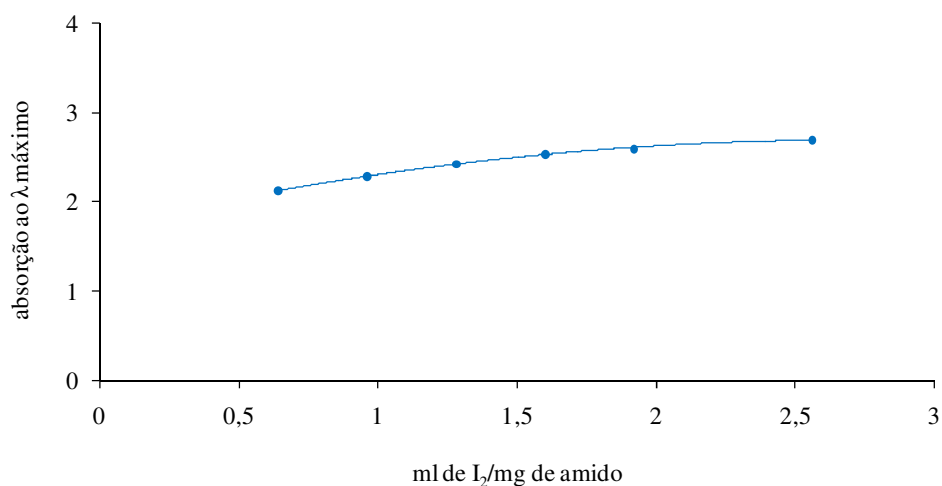


Figura 41 – Absorção obtida para várias quantidades de solução de iodo (2 mg I_2 + 20 mg de KI/ml)

Verificou-se pela Figura 41 que a partir de 1,92 ml da solução de iodo por mg de amostra de amido a absorção é aproximadamente constante. Este foi o volume de solução de I_2 escolhido para garantir a complexação de toda a amilose e amilopectina.

Foi também necessário determinar o coeficiente de absorção para a amilose e para amilopectina na presença da solução de iodo. Os comprimentos de onda máximos e os respectivos coeficientes de absorção estão esquematizados na Tabela 5, capítulo 3.4.11. O comprimento de onda máximo da amilose fica na zona dos 655, 5 nm e o da amilopectina na zona dos 551 nm.

Para determinação da quantidade de amilose e de amilopectina na madeira usou-se a solução de extraída com água, imediatamente depois da extracção, antes de qualquer tratamento (ver procedimento no capítulo 3.3.1). A quantidade de amido extraída é bastante baixa, não sendo por isso uma amostra representativa do amido existente na

madeira. No entanto é possível caracterizar o amido extraído quanto à sua composição em amilose e amilopectina. Tendo-se utilizado aproximadamente 5 g de madeira e 150 ml de água na extracção, obteve-se na solução final 21,4 mg de amido, dos quais 17,7 mg são amilopectina (~83%) e 3,7 mg são amilose (~17%). Assim a quantidade extraída de amido em base madeira é cerca de 0,47% e é mais rica na componente amilopectina do amido.

A quantidade de amido na madeira não pode ser determinada por este método visto não se ter extraído todo o amido existente na madeira, no entanto foi possível determinar a sua composição. Para uma caracterização mais completa das glucanas da madeira de *E. globulus* é necessário recorrer a outras técnicas.

4.2.3 Caracterização das glucanas da pasta e da madeira

Para comprovar claramente a existência de α -glucose e compreender o seu comportamento durante o cozimento, especialmente no *E. globulus*, decidiu-se extrair uma pasta kraft e a madeira. Efectuou-se uma caracterização exaustiva das glucanas extraídas de forma a fornecer o máximo de informação possível em relação à sua estrutura, em particular em relação à sua ligação com a xilana, mas também em relação ao seu comportamento no cozimento, nomeadamente se as glucanas podem precipitar em simultâneo com as xilanas.

Antes da utilização dos vários métodos a pasta e a madeira foram previamente extraídas com uma mistura etanol:tolueno (2:1). A pasta kraft utilizada na extracção das glucanas foi previamente enriquecida por precipitação por extensão do cozimento e acidificação do licor negro para um valor de pH de 11,5. Assim, tentou-se maximizar a quantidade de glucana final na pasta, caso esta precipite conjuntamente com a xilana (ver capítulos 3.5.1), uma vez que as xilanas extraídas com NaOH_{aq} tinham muito pouca quantidade de glucose. A pasta foi extraída com água a 120°C durante 1 hora, filtrada, lavada e as glucanas foram recuperadas por acidificação e posterior precipitação sob metanol:etanol (*GPHP*) (ver procedimento no capítulo 3.3.1).

As glucanas da madeira foram extraídas com água ou com NaOH_{aq} a 120°C durante 2 hora e recuperadas dos extractos utilizando vários métodos diferentes (ver procedimento no capítulo 3.3.1). A glucana da madeira, que foi extraída com uma solução aquosa de

NaOH, foi recuperada por precipitação (*GMAPp*). As outras glucanas da madeira foram extraídas com água e recuperadas dos extractos por diferentes métodos: por precipitação (*GMHPp*), por liolização directa do extracto (*GMHLz*) ou por diálise do extracto e posterior liofilização (*GMHDz*)

4.2.3.1 Análise da composição em monossacarídeos

A análise aos monossacarídeos pode fornecer alguma informação importante em relação à composição em glucose e xilose das glucanas extraídas. As xilanas isoladas anteriormente continham grandes quantidades de xilose, e neste caso um dos objectivos principais era ver se a extracção das glucanas da madeira arrasta consigo quantidades significativas de xilose. O outro objectivo importante desta parte do trabalho era tentar perceber se as glucanas precipitam conjuntamente com as xilanas, através da composição dos extractos da pasta.

A quantidade de glucana extraída da pasta foi bastante baixa (rendimento de ~ 0,4%) mas apresentou um teor de glucose bastante elevado, sendo teor de xilose o mais significativo. Verificou-se, pela análise aos monossacarídeos, resumida na Tabela 22, que o teor de glucose obtido foi bastante superior aquele que se obtiveram quando se extraiu as xilanas da pasta ou da madeira pelo método alcalino utilizado anteriormente (capítulo 3.2.1 e capítulo 1.1) uma vez que as xilanas, a 120 °C, são menos solúveis em água que em soluções alcalinas.

Tabela 22 – Composição dos polissacarídeos extraídos da pasta kraft (% , valores normalizados).

Amostra	Rham	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Rendimento da extracção, %
GPHPp	0,1	0,8	66,1	0,2	10,9	22,0	0,4

É de se notar que as extracções alcalinas das pastas (capítulo 1.1) resultaram em xilanas muito pouco ricas em glucose. Na extracção com água a amostra apresentou um teor de glucose e de galactose elevado, revelando que possivelmente as glucanas e as galactanas co-precipitaram com as xilanas.

Com as amostras de glucanas obtidas a partir da madeira conseguiram-se resultados variados (Tabela 23). Como seria de esperar, a extracção alcalina (amostra *GMAPp*) apresentou um rendimento mais elevado, devido essencialmente à grande quantidade de xilanas que se extraiu. Esta não é uma amostra adequada para a caracterização das glucanas visto a xilose mascarar os resultados referentes à glucose nas várias técnicas utilizadas (Tabela 23).

O método por precipitação, depois da extracção com água (*GMHPp*), foi o que apresentou o rendimento mais baixo. Este método apenas recupera os polissacarídeos de maior peso molecular, susceptíveis de precipitar sob metanol:etanol por serem insolúveis nesta mistura. Os polissacarídeos de menor peso molecular mantêm-se solúveis na mistura de álcoois. No entanto, pela análise que se fez à Tabela 23, verificou-se que o método de precipitação é bastante mais selectivo, precipitando os polissacarídeos mais ricos em glucose.

O rendimento e composição das duas últimas amostras (*GMHLz* e *GMHDz*) foram idênticos, embora a segunda tenha apresentado uma maior grau de pureza. Além da amostra *GMHDz* ser deslenhificada (a contrário da amostra *GMHLz* que apresentou alguma lenhina), apresentou um teor de glucose superior face aos outros monossacarídeos. Assim, a amostra *GMHDz* apresentou-se mais adequada para os estudos estruturais

Tabela 23 – Composição dos polissacarídeos extraídos da madeira (% valores normalizados).

Amostra	Rham	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Rendimento da extracção, %
<i>GMAPp</i>	2,2	2,4	68,8	1,2	10,9	14,4	3,4
<i>GMHPp</i>	1,6	1,6	15,8	5,5	12,5	63,0	0,8
<i>GMHLz</i>	3,0	6,4	26,5	10,4	13,4	40,2	2,4
<i>GMHDz</i>	2,9	3,7	22,8	8,6	8,6	53,5	1,7

A extracção com água conseguiu recuperar claramente glucanas, mas também glucomananas e galactanas, pelo alto teor de manose e galactose que se obteve. O teor de xilose foi também bastante elevado, resultado de uma possível ligação às glucanas ou de xilanas de muito baixo peso molecular, solúveis em água (Tabela 23).

Fez-se passar a amostra *GMHDz* por uma coluna de cromatografia de troca aniónica para tentar purificar as glucanas e reter as xilanas através das cargas dos seus grupos ácido. Não foi possível separar as glucanas das xilanas. Este resultado fortalece a hipótese de as glucanas e as xilanas estarem ligadas.

A composição em manose e galactose variou bastante de amostra para amostra. Verificou-se que na glucana extraída da pasta (*GPHPp*), a manose é um açúcar minoritário, não chegando a ser 1% (Tabela 22). Nas outras amostras extraídas com água (*GMHPp*, *GMHDz* e *GMHLz*) a composição em manose apresentou-se bastante mais elevada, chegando a atingir ~10% (Tabela 23). A elevada composição em manose nas amostras extraídas da madeira pode resultar das glucomananas na madeira (24) e como estas se degradam no cozimento não se encontraram valores elevados na pasta.

Outro dado importante a realçar foi a elevada composição em galactose encontrada em todas as amostras, sempre superior a 8,5% e alguma ramnose e arabinose. Estes açúcares podem provir eventualmente de galactanas que tenham sido extraídas juntamente com os outros polissacarídeos. A percentagem de galactose manteve-se bastante elevada depois do cozimento, enquanto a ramnose e arabinose apresentaram valores bastante mais baixos (Tabela 22). Estes resultados permitem concluir que a cadeia principal de galactose das galactanas se mantém bastante estável enquanto as cadeias de ramnose e arabinose são bastante atacadas durante o cozimento. O tratamento com ácido peracético, efectuada à amostra *GMHDz* (ver capítulo 3.3.1) tinha como objectivo purificar a amostra de restos de lenhina e também de pectinas que tivessem sido extraídas simultaneamente. A amostra *GMHDz* apresenta claramente um menor teor de galactose, resultado da eventual degradação/extracção dessas pectinas (Tabela 23).

Estes resultados mostram que não se consegue separar completamente a xilana, a glucana e alguma galactana. Todas as amostras de glucanas extraídas apresentaram teores de xilose que reforçam a ideia de estes dois monossacarídeos fazer parte do mesmo polissacarídeo. É necessário por isso caracterizar as amostras de glucanas extraídas para tentar compreender esta ligação.

A quantidade de glucana extraída da pasta demonstra que a glucana pode co-precipitar com a xilana. A ser verdade é um resultado muito interessante pois, esta glucana vai também contribuir para o aumento de rendimento final em pasta do cozimento kraft.

4.2.3.2 Determinação do peso molecular médio

O peso molecular médio das glucanas foi também determinado. Esperava-se um peso molecular médio bastante mais baixo do que aquele que se obteve para as xilanas da madeira. O peso molecular médio obtido para a glucana *GMHDz* foi de 8400 Da enquanto que para a *GPHPP* o valor obtido foi de 7300 Da. A descida verificada entre os pesos moleculares das glucanas da madeira e da pasta veio confirmar o que se esperava, visto as glucanas também sofrerem reacções de degradação. Apesar do valor da *GPHPP* ser inferior, a diminuição verificada é pouco significativa, revelando que a glucana apresenta alguma resistência à degradação.

Note-se que as amostras que se analisaram são amostras extraídas com água, com um rendimentos de extracção reduzidos (Tabela 22 e Tabela 23), e que naturalmente não são amostras representativas de toda a glucana da madeira, no entanto esta análise permite ter uma ideia dos pesos moleculares destes polissacarídeos.

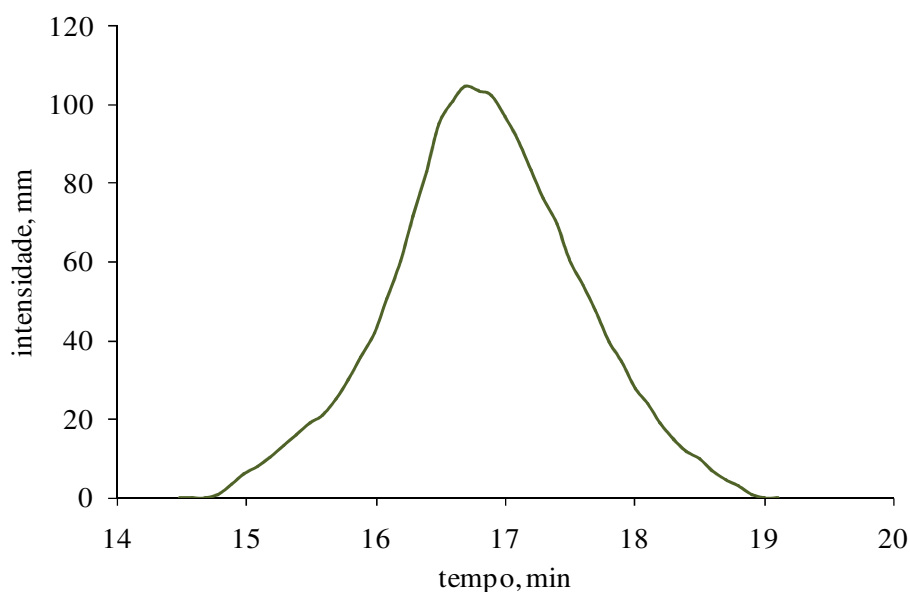


Figura 42 - Curva de eluição de GPC da glucana *GMHDz*.

A curva de eluição obtida é uma curva larga, revelando a eluição de polissacarídeos com pesos moleculares significativamente diferentes (Figura 42). Pela curva de eluição é possível identificar um pequeno ombro no pico principal, por volta dos 15,5 min, que talvez resulte de um polímero mais ramificado (como a amilopectina e que apresenta um volume hidrodinâmico superior) (Figura 42).

Estes resultados mostram que embora as glucanas da madeira apresentem um peso molecular médio inferior ao das xilanas, estas apresentam ainda assim uma estrutura de peso molecular médio significativo e resistente às condições alcalinas.

4.2.3.3 Análise de ligações por metilação

As técnicas utilizadas até aqui permitiram caracterizar as glucanas sumariamente. No entanto, é de todo o interesse complementar esta caracterização de forma a entender a sua estrutura e compreender se existe alguma ligação entre as glucanas e as xilanas e se essa ligação existe, como é que ela se estabelece.

Pretendia-se com a análise por metilação às ligações da amostra *GMHDz* perceber que tipo de ligações estão envolvidas nesta glucana. O cromatograma obtido está apresentado na Figura 43.

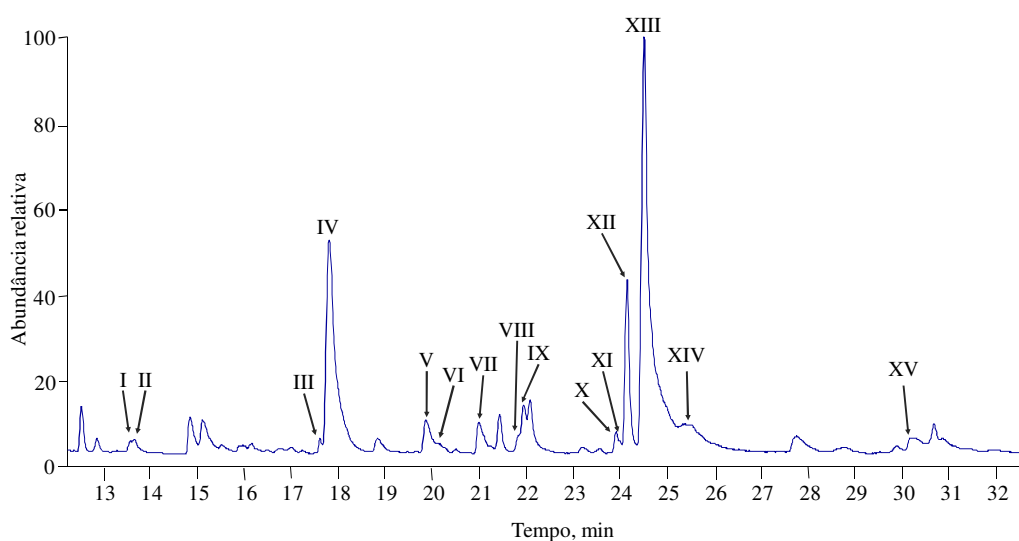


Figura 43 – Cromatograma obtido no GC-MS para a amostra *GMHDz*.

A amostra extraída da madeira apresentou claramente resíduos metilados característicos de glucanas e de glucomananas, como as unidades $\rightarrow 4$)-D-Glcp-(1 \rightarrow e $\rightarrow 3$)-D-Glcp-(1 \rightarrow , mas também ligações específicas de α -glucanas como o amido, como a unidade $\rightarrow 4,6$)-D-Glcp-(1 \rightarrow (Figura 43 e Tabela 24). Sabe-se que β -glucanas estão presente nas madeiras do tipo resinosas em pequenas quantidades (32, 53). No entanto a presença de β -glucanas no *E. globulus* não foi até agora confirmada. Pela análise do cromatograma e das abundâncias relativas dos resíduos metilados verificou-se que a quantidade de β -(1 $\rightarrow 3$)-glucana (resíduo X) é baixa, mas existe. Os resultados não permitiram determinar se a β -glucana da madeira de *E. globulus* envolve, para além das ligações β -(1 $\rightarrow 3$), ligações do tipo β -(1 $\rightarrow 4$).

Tabela 24 – Unidades estruturais mais relevantes identificadas a amostra *GMHDz*.

Resíduos metilados		Unidades estruturais identificadas	Razão molar relativa (/100 unid. de Glc)
Glc-2,3,6	XIII	$\rightarrow 4$)-D-Glcp-(1 \rightarrow	86
Glc-2,4,6	X	$\rightarrow 3$)-D-Glcp-(1 \rightarrow	4
Glc-2,3	XV	$\rightarrow 4,6$)-D-Glcp-(1 \rightarrow	3
Glc-2,3,4,6	VII	D-Glcp-(1 \rightarrow	7
Glc-2,3,4 (D2)	XIV	GlcA-(1 \rightarrow	2
Xyl-2,3	IV	$\rightarrow 4$)-D-Xylp-(1 \rightarrow	45
Xyl-2	VIII	$\rightarrow 3,4$)-D-Xylp-(1 \rightarrow	3
Xyl-3	IX	$\rightarrow 2,4$)-D-Xylp-(1 \rightarrow	10
Xyl-2,3,4	I	D-Xylp-(1 \rightarrow	2
Ara-2,3,5	III	$\rightarrow 4$)-D-Araf-(1 \rightarrow	3
Rha-2,3,4	II	D-Rhap-(1 \rightarrow	3
Gal-2,3,4,6	V	D-Galp-(1 \rightarrow	3
Gal-3,4,6	XI	$\rightarrow 2$)-D-Galp-(1 \rightarrow	3
Gal-2,3,6 ou	XII	$\rightarrow 4$)-D-Galp-(1 \rightarrow	36
Man-2,3,6		$\rightarrow 4$)-D-Manp-(1 \rightarrow	
Man-2,3,4,6	VI	D-Manp-(1 \rightarrow	2

As ligações características das xilanas apareceram bem identificadas no espectro de massa, com uma abundância relativa coerente com a composição de açúcares (Tabela 23). Conseguiu-se ainda identificar os resíduos metilados de galactopiranoses, arabinofuranoses e ainda pequenas quantidades de ramnopiranoses, oligómeros característicos das ramnoarabinogalactanas (presentes na xilana do *E. globulus*) (8).

Embora se tenha conseguido identificar o ácido metilglucurónico terminal (MeGlcA-(1→), não se conseguiu identificar o resíduo referente ao ácido metilglucurónico interior (→2)-MeGlcA -(1→). Devido à sua pouca abundância e ao facto do tempo de saída do seu pico molecular estar muito próximo dos picos da glucose, é muito provável que esteja mascarado debaixo de outros picos mais abundantes.

Não se conseguiu distinguir os resíduos metilados Gal-2,3,6 e Man-2,3,6 localizados na posição XII do espectro de massa (Figura 43), visto serem ambos hexoses com fragmentações e abundância idênticas. Na amostra em causa, as quantidades destes açúcares apresentaram-se muito próximas (Tabela 23), como tal não foi possível distinguir se o pico XII se refere à galactose ou à manose. Nesta zona do espectro há a possibilidade de os picos referentes a estes açúcares metilados se sobrepor, caso isso aconteça, a razão molar relativa individual deverá ser inferior, aproximadamente metade.

Estes resultados mostraram claramente a presença de glucanas $\alpha(1\rightarrow4)$ e $\alpha(1\rightarrow4,6)$ e de glucanas $\beta(1\rightarrow3)$ e $\beta(1\rightarrow4)$. As unidades estruturais identificadas revelaram a presença de MeGlcA, sugerindo que este ácido deverá ter um papel importante na estrutura das glucanas.

4.2.3.4 FTIR

A espectroscopia de FTIR permite complementar a informação obtida anteriormente pelo aparecimento de picos específicos referentes a novos grupos funcionais, face a uma glucana comercial. A Espectroscopia de Infra-vermelhos com transformada de Fourier (FTIR) é uma de espectroscopia de absorção. Num composto químico orgânico é possível observar vibrações de alongamento e de torção nas suas ligações quando estas absorvem energia na região dos infra-vermelhos. Esta técnica, a partir da detecção da absorção destas

energias, permite caracterizar estruturalmente as amostras pela identificação das vibrações características dos principais grupos funcionais. (173, 187).

Assim, foram realizadas análises de FTIR às glucanas extraídas da madeira (*GMHDz*, *GMHPp*) e foi feita uma comparação com uma α -glucana comercial. (Figura 44)

As amostras analisadas (*GMHDz*, *GMHPp*) apresentaram um espectro idêntico ao da glucana comercial (apenas é mostrado o espectro da amostra *GMHDz*). Em ambas as amostras de glucana extraída da madeira foi possível observar um pico, a 1725 cm^{-1} , característico da ligação C=O que existe nos grupos R-COOH. Na glucana comercial não se observa este pico. O mais provável é este pico resultar dos grupos carboxilos do MeGlcA que está ligado à xilana, que é extraída em simultâneo com as glucanas.

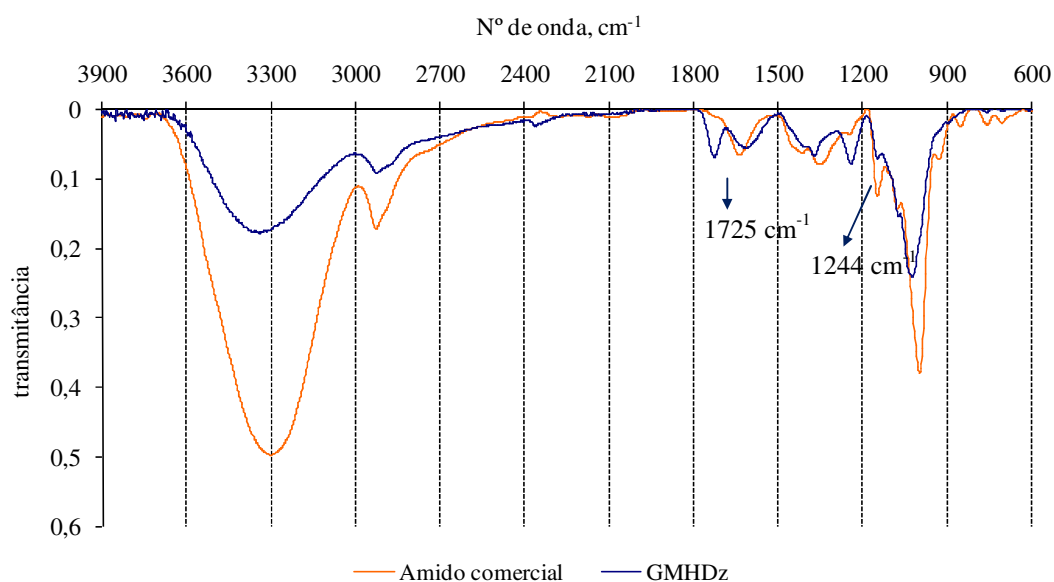


Figura 44 – Espectro de ATR da amostra *GMHDz* e do amido comercial.

Observou ainda um pico mais intenso a 1244 cm^{-1} que está na zona característica das vibrações de alongamento das ligações éteres. Este aumento de intensidade pode, mais uma vez, confirmar a presença do MeGlcA proveniente das xilanas, que tem a ligação O-metil na posição 4, incrementando naturalmente este tipo de ligação.

Estes resultados confirmaram os resultados anteriores, identificando-se mais uma vez, a presença de MeGlcA nas glucanas analisadas.

4.2.3.5 Espectroscopia de RMN

A espectroscopia de RMN foi utilizada de forma a complementar a informação estrutural obtida até aqui. Foram analisadas as amostras *GPHPp* e *GMHDz*. O espectro ^1H RMN obtido para a amostra *GMHDz* é idêntico ao espectro da amostra *GPHPp* e não é apresentado (Figura 45).

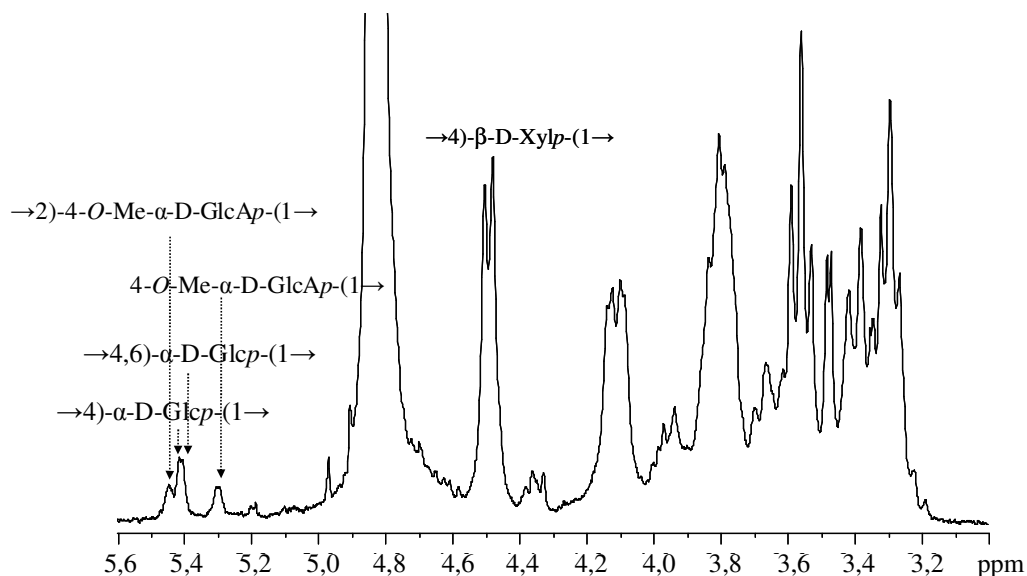


Figura 45 – Espectro de RMN ^1H da glucana extraída da pasta (*GPHPp*).

A espectroscopia de ^1H RMN (Figura 45) pôde confirmar a presença α -glucose na amostra de glucana extraída da pasta, pois foi possível observar os picos característicos desta glucana na zona 5,4, 5,2 e 4,97 ppm dos prótons anoméricos da α -glucose (184, 185). A quantidade de α -glucana encontrada na amostra da pasta (*GPHPp*) vem demonstrar, mais uma vez, que as glucanas podem eventualmente precipitar conjuntamente com as xilanas, uma vez que a xilana extraída da pasta original (sem a precipitação) apresenta quantidades muito baixas de glucose.

Foi possível identificar também a presença de MeGlcA terminal e MeGlcA interior (4-*O*-Me- α -D-GlcAp-(1 \rightarrow e \rightarrow 2)-4-*O*-Me- α -D-GlcAp-(1 \rightarrow) com os picos característicos por volta dos 5,29 e 5,44 ppm, respectivamente, confirmando mais uma vez a presença deste ácido na constituição das glucanas (Figura 45).

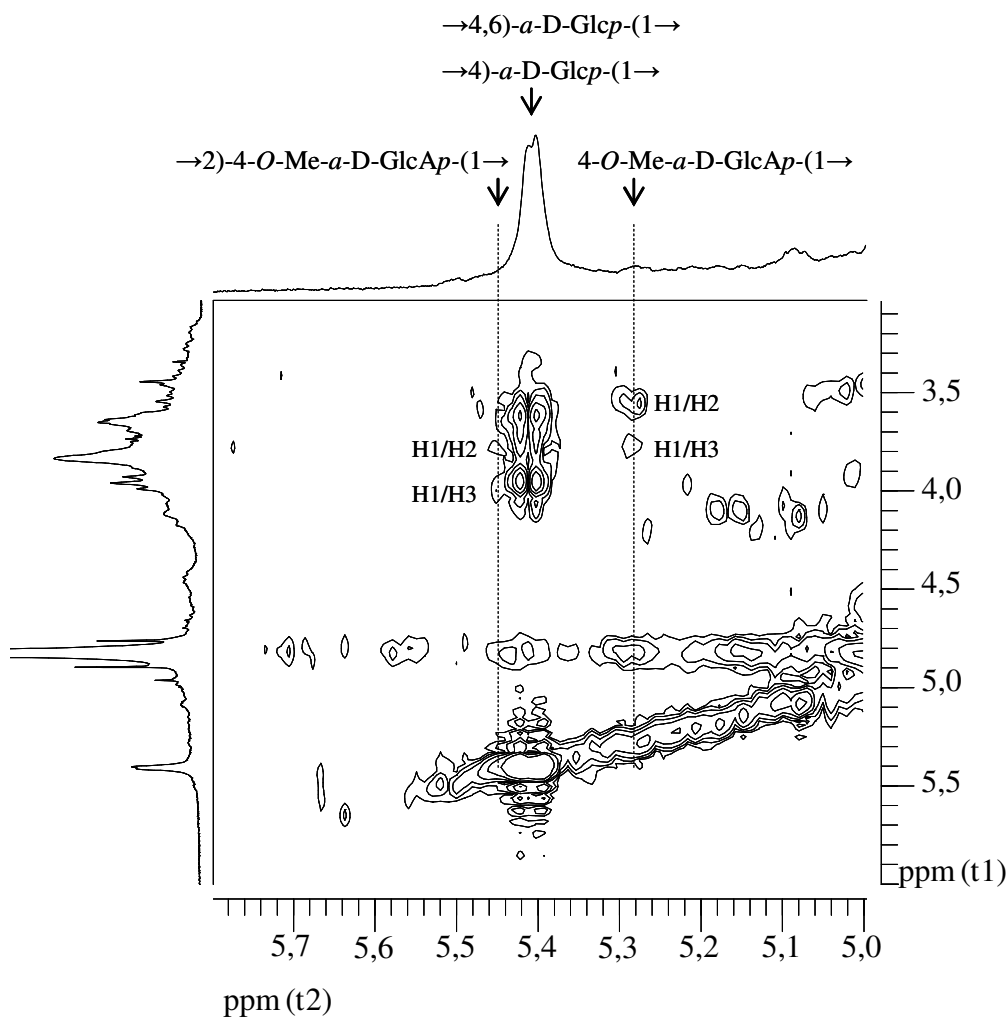


Figura 46 - Região anomérica do espectro de ^1H - ^1H TOCSY (D_2O , 30°C) da glucana extraída do *E. globulus* (GMHDz).

A espectroscopia a duas dimensões, ^1H - ^1H TOCSY (Figura 46) e a ^1H - ^{13}C HSQC (não mostrado), confirmou os resultados obtidos na espectroscopia a uma dimensão, ^1H RMN. Observou-se os picos característicos da α -glucana correspondente às ligações $\rightarrow 4,6)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow$ e $\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow$ (5,41 e 5,42 ppm, a 5,2 ppm e a 4,97 ppm), já atribuídas anteriormente nas glucanas identificadas nas xilanas do licor negro (ver capítulo 4.1.2.5) (184, 185).

Identificou-se também no espectro de TOCSY, embora em muito pouca abundância, a presença de picos característicos das ligações $\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow$ e $\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Glcp}$, na zona dos 4,5 – 4,7 ppm (não mostrado).

A região anomérica do espectro de TOCSY confirma também a presença do MeGlcA substituído na posição 2 (Figura 46). Observou-se uma deslocação dos prótons para campos mais baixos quando comparados com os picos correspondentes ao grupo ácido não substituído: o H-1 de 5,28 para 5,44 ppm, o H-2 de 3,58 para 3,77 ppm e o H-3 de 3,81 para 3,93 ppm (8). De acordo com o espectro de RMN e TOCSY (Figura 45 e Figura 46) a proporção de grupos MeGlcA substituídos em *O*-2 e não substituídos é baixa. No entanto deverão ser estes grupos substituídos na posição 2 a ligação entre a xilana e a α -glucana.

Depois de se confirmar a presença de α -glucose como a glucana maioritária e a presença do MeGlcA nas amostras de glucanas extraídas da madeira e da pasta, é interessante aprofundar a caracterização estrutural de forma a confirmar se o MeGlcA está envolvido na ligação que se estabelece entre a xilana e a glucana.

Poderia pensar-se em empregar a outras técnicas espectroscópicas, no entanto, e uma vez que as abundâncias são muito baixas, seria difícil de obter uma caracterização estrutural fiável (7, 8). Assim recorreu-se à espectrometria de massa para tentar comprovar estas ligações.

4.2.3.6 Hidrólise enzimática e análise por espectrometria de massa

Este estudo tinha como principal objectivo entender como é que a xilanas e as glucanas estavam ligadas. Além dos resultados anteriores apontarem para uma ligação entre estes dois polissacarídeos, verificou-se no isolamento das glucanas e das xilanas a presença de outros açúcares em quantidades significativas (xilose e glucose, respectivamente), sendo a purificação destas amostras bastante difícil.

Nos últimos anos tem sido comum o uso de enzimas para promover a hidrólise, visto estas serem bastante selectivas. A eficiência da hidrólise enzimática e da hidrólise ácida é idêntica, no entanto, o uso de enzimas comuns como as xilanases preserva as ligações entre o ácido hexenurónico e a xilopirranose, visto esta ligação necessitar de enzimas mais específicas. Em estudos estruturais, a hidrólise enzimática além de permitir a quantificação dos ácidos urónicos (HexA e MeGlcA), permite também a identificação de outros xilo-oligossacarídeos, como HexA-Xyl₂ e os HexA-Xyl₃ (34, 112, 124, 184, 186, 188-191). A hidrólise enzimática, com uma enzima do tipo xilanase, permitirá também identificar as

glucanas da madeira e, se estas estiverem ligadas de alguma forma à xilana, a sua ligação à cadeia de xiloses será preservada e consequentemente passível de ser identificada.

Assim, foi feita a hidrólise enzimática da amostra *GMHDz*, de forma a conseguir dividir os políssacarídeos em oligossacarídeos mais fáceis de analisar. Desta forma tentou-se não partir excessivamente as glucanas de modo a manter as ramificações principais, para posterior análise por espectrometria de massa. A enzima utilizada foi a Econase[®] HC-400, cuja actividade principal é de endo-xilanase, embora tenha também outras actividades associadas, β -glucanase, celulase e amiloglucosidase. Esta enzima quebra essencialmente as ligações glicosídicas existentes entre os monómeros das xilanas (β -xilose), mas cinde também em alguma extensão as ligações β - e α -glucose (presentes nas glucanas), preservando-se preferencialmente as ligações desejadas, que neste caso são as ligações xilose-glucose ou xilose-metilglucurónico-glucose (125, 185, 190).

As várias fracções obtidas foram separadas por cromatografia de afinidade/exclusão molecular (LEX/SEC). O isolamento e fraccionamento de oligo e polissacarídeos podem ser feitos eficazmente por cromatografia de exclusão molecular (SEC), separando-os como foi visto anteriormente pelo seu volume hidrodinâmico (34, 37, 54, 121, 182). A fracção ácida eluiu aos 10,5 minutos e as fracções ricas em trímeros e dímeros neutros aos 19 e 20 minutos. O pico que elui entre os 12 e os 17 minutos corresponde ao pico da enzima (Figura 47).

As fracções obtidas foram então analisadas por espectrometria de massa (ESI-MS, ESI-MS/MS, ESI-MSⁿ). A espectrometria de massa é uma técnica bastante usada no estudo estrutural de xilanas e de outros polissacarídeos (192-196). Além de permitir obter informações sobre a massa molecular dos oligossacarídeos constituintes da amostra, esta técnica permite também determinar detalhes estruturais como os padrões de substituição de grupos acetilo (193, 195) ou ramificações de açúcares (196) através da análise dos espectros de ESI-MS/MS e ESI-MSⁿ.

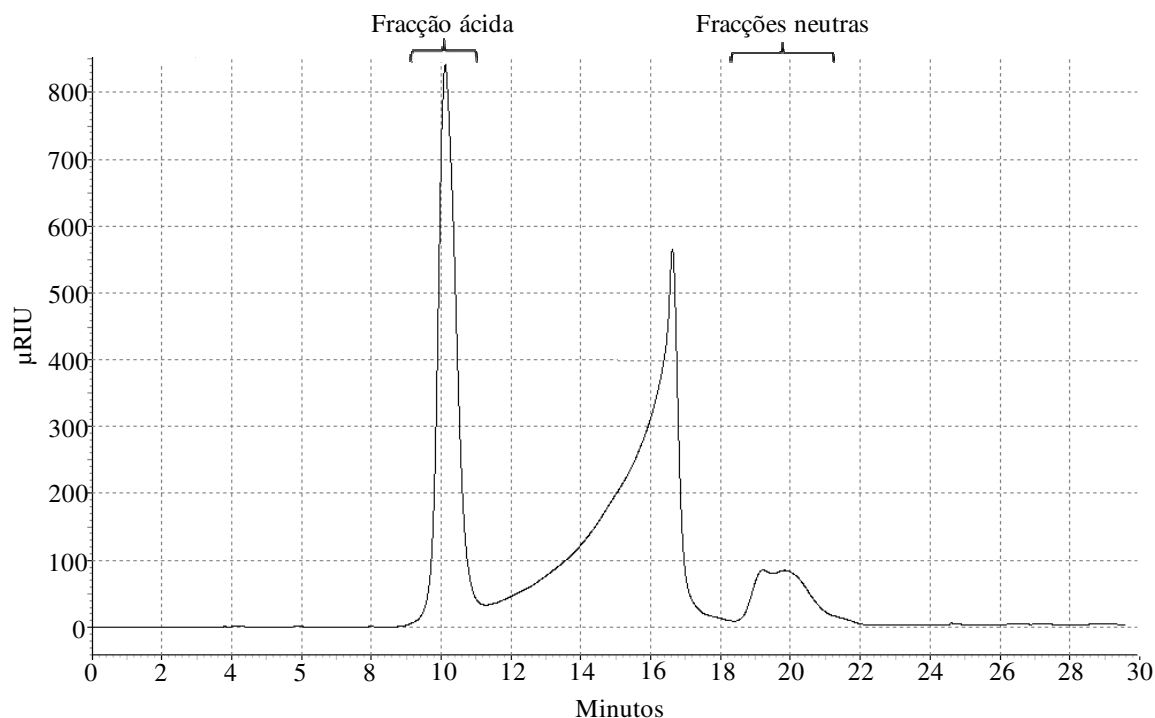


Figura 47 – Cromatograma obtido no LEX/SEC para a glucana da madeira, depois da hidrólise enzimática.

Das fracções de glucanas recolhidas apenas se obteve resultados significativos na fracção que eluiu aos 10,5 minutos, a qual corresponde à fracção ácida. Nas fracções neutras, eluídas aos 19 e 20 minutos, só foi possível identificar oligómeros de hexose, principalmente dímeros e trímeros. Assim a fracção ácida foi analisada por espectrometria de massa de ionização por electrospray (ESI-MS, ESI-MS/MS e ESI-MSⁿ). O uso destas técnicas tinha como objectivo principal compreender como é que a xilanas e as glucanas coexistiam, isto é, se as xilanas e as glucanas estariam ligadas entre si, e se sim, como é que essa ligação poderia ocorrer.

Os oligómeros mais abundantes identificados por esta técnica, Xyl₂Ac-MeGlcA, Xyl₂Ac-MeGlcA-Hex e Xyl₄Ac-MeGlcA, não apresentam hexoses ou contém apenas uma unidade de hexose na sua constituição (Figura 48). Estes oligossacarídeos da madeira de *E. globulus* e de outras folhosas foram já estudados por MS e por outras técnicas (183, 195, 196), cujos resultados permitiram identificar unidades de xilose substituídas com um ou dois grupos acetilo e suas fragmentações características em MS/MS (195) e ainda a presença de uma unidade de hexose ligada ao grupo metilglucurónico, como ramificação de uma xilose (195). Para este trabalho, e tendo em conta o que se pretendia, estes

oligómeros não foram considerados por já terem sido caracterizados estruturalmente por ESI-MS/MS.

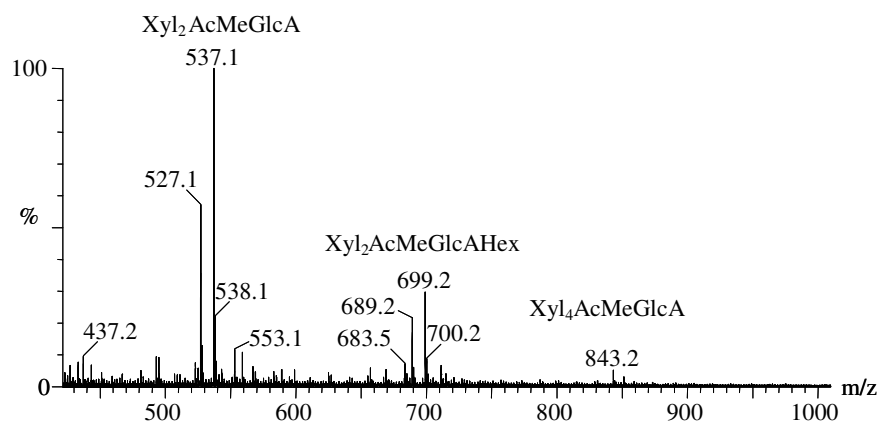


Figura 48 - Espectro de massa (ESI-MS) da fracção ácida da glucana da madeira com a identificação das espécies mais abundantes

No espectro de ESI-MS da fracção ácida (Figura 48) foram identificados os seguintes aductos de sódio de menor abundância mas mais relevantes:

m/z : 525, 687, 849 e 1011 - Xyl-MeGlcA-Hex_n com $n=1-4$;

m/z : 819, 981 - Xyl₂-MeGlcA-Hex_n com $n=2$ e 3;

m/z : 567, e 1053 - XylAc-MeGlcA-Hex_n com $n=1$ e 4;

m/z : 699, 861 - Xyl₂Ac-MeGlcA-Hex_n com $n=1$ e 2

Note-se que uma vez que a extracção das amostras foi realizada com água, esperava-se encontrar grupos acetilo e que estes fossem fáceis de identificar, o que vem de acordo com os oligossacarídeos identificados, que apresentam em alguns casos grupos acetilos.

De modo a confirmar a composição e a estrutura primária destes oligómeros estudou-se a fragmentação obtida por MS/MS. Observaram-se diferentes vias de fragmentação, algumas delas bastante comuns e correspondentes a perdas de moléculas neutras. Estas perdas estão resumidas na Tabela 25.

Tabela 25 – Perdas de neutros e respectivas massas encontradas nas várias vias de fragmentação analisadas nos espectros de massa (ESI-MS/MS).

Neutros	Massa
H ₂ O	18 Da
Ac	60 Da
Xyl	132 Da
Xyl-Ac	174 Da
Hex	162 Da
Hex terminal	180 Da (162 + 18)
Hex-Hex	324 Da (2x162)
Hex-Hex terminal	342 Da
MeGlcA	190 Da
MeGlcA terminal	208 Da
Xyl-MeGlcA	322 Da (190+132)
Xyl ₂ -MeGlcA	454 Da
Xyl-Ac-MeGlcA	364 Da

No grupo de oligómeros correspondentes a estruturas não acetiladas e com apenas uma xilose, foi encontrado o íon com m/z 525. Observaram-se para este íon foram duas vias de fragmentação distintas, que vão de encontro à mesma estrutura final ([Xyl-MeGlcA-Hex+Na]⁺).

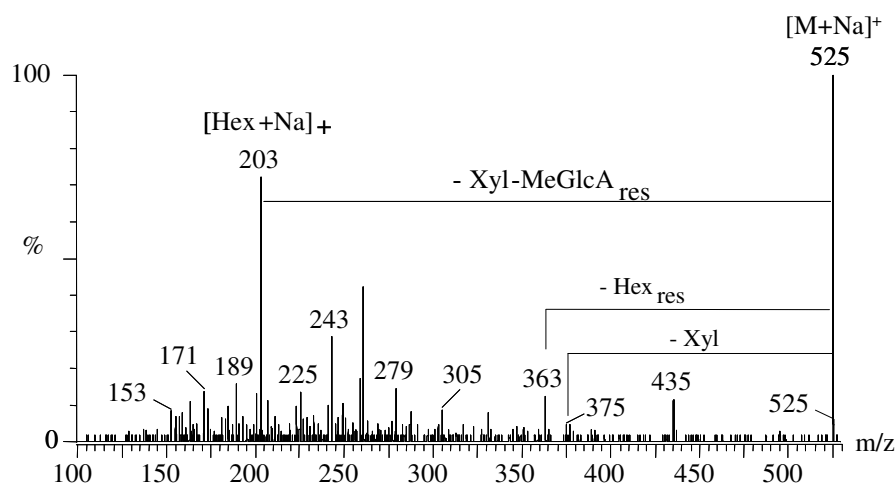


Figura 49 –Espectro de ESI-MS/MS do íon [M+Na]⁺ de m/z : 525. Identificação da via de fragmentação mais abundante.

Na via de fragmentação mais abundante a perda de 322 Da correspondente à perda de Xyl-MeGlcA residual, formando o ião $[\text{Hex}+\text{Na}]^+$ (para m/z 203) (Figura 49, Tabela 25 e Tabela 26). Na segunda via de fragmentação verificou-se a perda de um resíduo de hexose (Hex) (-162 Da) seguida da perda de um resíduo de MeGlcA (-190 Da), com formação de um ião com m/z 173, correspondente à formação de $[\text{Xyl}+\text{Na}]^+$ (Tabela 26).

Tabela 26 – Fragmentações detectadas para os oligossacarídeos do tipo Xyl-MeGlcA-Hex_n com n=1-4

[M+Na] ⁺ (m/z)	Fragmentações (m/z)				Estrutura do ião molecular
525	- 322 Da				[Xyl-MeGlcA-Hex+Na] ⁺
	→ 203				
	- 162 Da	- 190 Da			
	→ 363	→ 173			
687	- 322 Da	-162 Da			[Xyl-MeGlcA-Hex ₂ +Na] ⁺
	→ 365	→ 203			
	- 162 Da	- 180 Da	- 132 Da		
	→ 363	→ 173	→ 213		
849	- 162 Da	- 180 Da	- 162 Da		[Xyl-MeGlcA-Hex ₃ +Na] ⁺
	→ 687	→ 507	→ 345		
	- 180 Da	- 162 Da	- 162 Da		
	→ 669	→ 507	→ 345		
	- 322 Da	- 162 Da	- 162 Da		
	→ 527	→ 365	→ 203		
1011	- 162 Da	- 162 Da	- 180 Da		[Xyl-MeGlcA-Hex ₄ +Na] ⁺
	→ 849	→ 687	→ 507		
	- 322 Da	- 162 Da	- 162 Da	- 162 Da	
	→ 689	→ 527	→ 365	→ 203	
	- 162 Da	- 162 Da	- 322 Da	- 162 Da	
	→ 849	→ 687	→ 365	→ 203	

A via de fragmentação mais abundante revelou que a ligação Xyl-MeGlcA é bastante forte, especialmente em comparação com a ligação existente entre o MeGlcA e a Hex.

Observou-se perdas de Xyl-MeGlcA (-322 Da) em maior abundância. Verificou-se também a perda de uma Hex_{res} (-162 Da) resultando no ião [Xyl-MeGlcA +Na]⁺ de m/z : 363. Uma vez que a eliminação de um grupo MeGlcA a partir do ião precursor [M+Na]⁺ não foi observada, a sua localização mais provável é entre a xilose e a hexose (Tabela 26).

O aducto de sódio detectado a m/z 687, corresponde ao tetrassacarídeo [Xyl-MeGlcA-Hex₂+Na]⁺. No espectro de ESI MS/MS deste ião encontraram-se duas vias de fragmentação, confirmando a estrutura proposta. Na via mais abundante pôde observar-se uma perda de 322 Da, com formação de m/z 365, correspondente a [Hex₂+Na]⁺, seguido da perda de uma hexose residual (-162 Da), resultando na formação do ião [Hex+Na]⁺ (m/z 203) (Figura 50, Tabela 25 e Tabela 26).

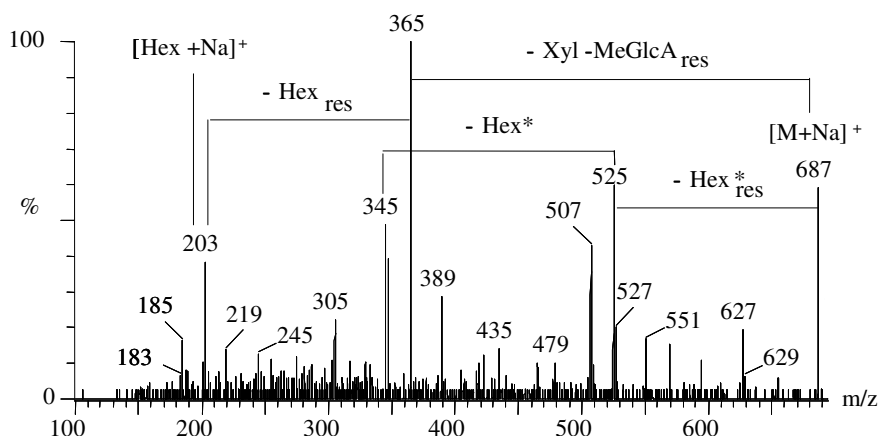


Figura 50 – Espectro de ESI-MS/MS do ião [M+Na]⁺ de m/z : 687. Identificação das vias de fragmentação mais abundante. * 2ª via de fragmentação.

Para o ião [M+Na]⁺ com m/z 849 observaram-se três vias de fragmentações distintas, que permitiram a sua identificação como um pentassacarídeo do tipo [Xyl-MeGlcA-Hex₃+Na]⁺. Foi visto que, em todas as vias de fragmentação, se verificaram duas perdas 162 Da. Em duas das vias possíveis verificou-se ainda a perda de uma hexose terminal (-180 Da) com formação do resíduo final de [Xyl-MeGlcA+Na]⁺ (para m/z 345). Na terceira via encontrou-se uma perda de 322 Da, correspondente à perda de Xyl-MeGlcA, com formação do ião de m/z 365 - [Hex₂+Na]⁺ (Tabela 25 e Tabela 26).

Identificou-se também um ião com m/z 1011, correspondente a um hexassacarídeo - [Xyl-MeGlcA-Hex₄+Na]⁺. As vias de fragmentação encontradas estão esquematizadas na Tabela 26. Numa das possíveis vias de fragmentação, formaram-se os iões m/z 849 e m/z

687 por perda de dois resíduos de hexose consecutivos. Posteriormente observou-se a perda de Xyl-MeGlcA e formação do ião $[\text{Hex}_2+\text{Na}]^+$, com m/z 365, e outra perda de um resíduo de hexose, dando origem a m/z 203, que corresponde a uma hexose terminal ($[\text{Hex}+\text{Na}]^+$). Esta via de fragmentação confirmou a estrutura proposta.

Observou-se também a fragmentação iniciada pela perda do bloco Xyl-MeGlcA (-322 Da), com formação do ião com m/z 689, e posterior perda de três hexoses consecutivas, formando a espécie correspondente a uma hexose terminal $[\text{Hex}+\text{Na}]^+$, com m/z 203 (Figura 51 e Tabela 25).

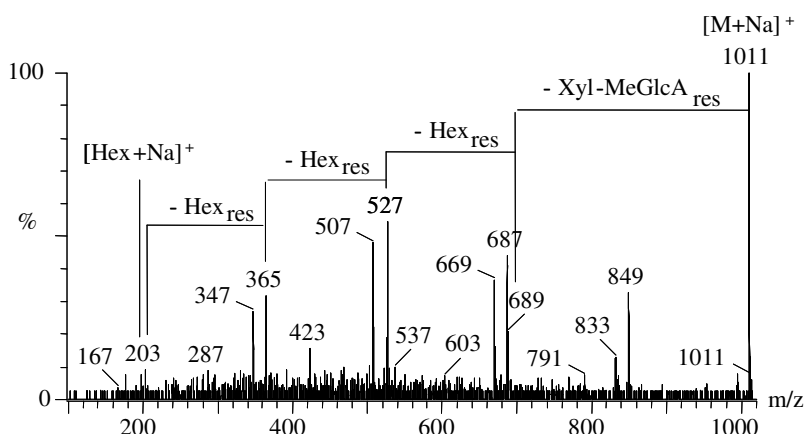


Figura 51 – Espectro de ESI-MS/MS do ião $[\text{M}+\text{Na}]^+$ de m/z : 1011. Identificação da via de fragmentação mais abundante.

Observaram-se em todos estes espectros vias de fragmentação comuns, ou seja, com perdas de hexose e do bloco Xyl-MeGlcA. A perda do grupo aldobiurônico (Xyl-MeGlcA) comprova a estrutura dos oligossacarídeos identificados onde a ligação que se estabelece entre a xilose e o MeGlcA é bastante forte. A ausência de iões fragmentos devido à perda de MeGlcA a partir do ião $[\text{M}+\text{Na}]^+$ precursor, assegura que o MeGlcA está localizado entre a xilose e a hexose.

No espectro de ESI-MS da fracção ácida foi possível identificar também dois oligossacarídeos com duas xiloses, de estruturas $\text{Xyl}_2\text{-MeGlcA-Hex}_2$ com m/z 819 e a $\text{Xyl}_2\text{-MeGlcA-Hex}_3$ com m/z 981.

Para o ião a m/z 819 observaram-se duas fragmentações distintas, em ambas foi observado uma perda inicial de um resíduo de xilose, com formação do ião de m/z 687. Numa das vias de fragmentação seguiu-se a perda de um resíduo de uma hexose terminal e consequente formação de $[\text{Xyl-MeGlcA-Hex}+\text{Na}]^+$ (m/z 507) e a perda de duas hexoses em

simultâneo e consequente formação de $[\text{Xyl-MeGlcA}+\text{Na}]^+$ (m/z 363). Desta forma confirmou-se a composição deste oligossacarídeo (Tabela 27).

Tabela 27 - Fragmentações detectadas para os oligossacarídeos do tipo $\text{Xyl}_2\text{-MeGlcA-Hex}_n$ ($n=1$ e 2)

$[\text{M}+\text{Na}]^+$ (m/z)	Fragmentações (m/z)		Estrutura do ião molecular
819	- 132 Da	- 180 Da	$[\text{Xyl}_2\text{-MeGlcA-Hex}_2+\text{Na}]^+$
	→ 687	→ 507	
	- 132 Da	- 324 Da	
	→ 687	→ 363	
981	- 454 Da	- 162 Da	$[\text{Xyl}_2\text{-MeGlcA-Hex}_3+\text{Na}]^+$
	→ 527	→ 365	
		- 180 Da	
		→ 185	
	- 190 Da	- 132 Da	
	→ 791	→ 659	
		→	
	- 132 Da	- 162 Da	
	→ 527	→ 365	
		- 180 Da	
		→ 185	

No espectro de ESI-MS/MS, observaram-se para o ião com m/z 981 duas vias de fragmentação (Figura 52 e Tabela 27).

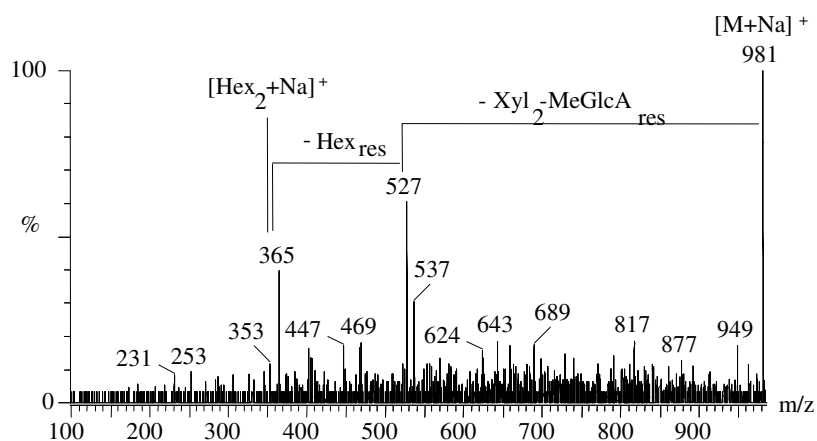


Figura 52 – Espectro de ESI-MS/MS do ião $[\text{M}+\text{Na}]^+$ de m/z : 981. Identificação da via de fragmentação mais abundante.

Na via de fragmentação mais abundante verificou-se a perda de 454 Da, que corresponde à perda de $\text{Xyl}_2\text{-MeGlcA}$, com formação do ião com m/z 527 e posterior perda

consecutiva de um resíduo de hexose e de uma hexose terminal, com a formação do resíduo $[\text{Hex}+\text{Na}]^+$ a m/z 185. Este ião foi identificado como $\text{Xyl}_2\text{-MeGlcA-Hex}_3$ (Figura 52 e Tabela 27).

Foi identificada também a estrutura $\text{Xyl}_5\text{-MeGlcA}$ com m/z 891. Observaram-se para este oligômero duas vias de fragmentação, uma com formação de $[\text{Xyl}_2+\text{Na}]^+$ (para m/z 287) e outra com a formação de $[\text{Xyl-MeGlcA}+\text{Na}]^+$ (m/z 363) (Tabela 25 e Tabela 28).

Tabela 28 - Fragmentações detectadas para o oligossacarídeos $\text{Xyl}_5\text{-MeGlcA}$.

$[\text{M}+\text{Na}]^+$ (m/z)	Fragmentações (m/z)				Estrutura do ião molecular
891	- 208 Da	- 132 Da	- 132 Da	- 132 Da	$[\text{Xyl}_5\text{-MeGlcA} + \text{Na}]^+$
	→ 683	→ 551	→ 419	→ 287	
	- 132 Da	- 132 Da	- 132 Da	- 132 Da	
	→ 759	→ 627	→ 495	→ 363	

Nos oligossacarídeos acetilados foram encontradas as estruturas: XylAc-MeGlcA-Hex com m/z 567, $\text{XylAc-MeGlcA-Hex}_4$ com m/z 1053, $\text{Xyl}_2\text{Ac-MeGlcA-Hex}$ com m/z 699 e $\text{Xyl}_2\text{Ac-MeGlcA-Hex}_2$ com m/z 861.

Para o ião com m/z 567, observaram-se duas vias de fragmentação possíveis, onde na mais abundante se verificou uma perda inicial de 162 Da (resíduo de hexose) seguida de uma perda de um resíduo de MeGlcA (-190 Da), formando o ião final $[\text{XylAc}+\text{Na}]^+$ (para m/z 215) (Figura 53 e Tabela 29.)

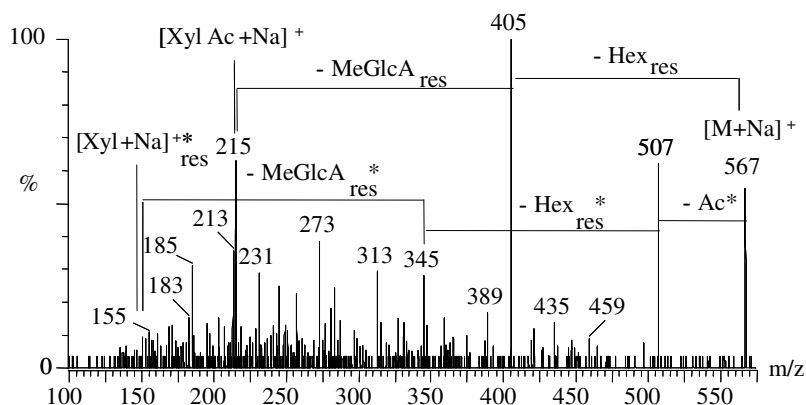


Figura 53 – Espectro de ESI-MS/MS do ião $[\text{M}+\text{Na}]^+$ de m/z : 567. Identificação das vias de fragmentação mais abundante. * 2ª via de fragmentação.

Tabela 29 – Fragmentações detectadas para os oligossacarídeos do tipo Xyl_mAc-MeGlcA-Hex_n com m= 1 e 2 e n=1 e 4

[M+Na] ⁺ (m/z)	Fragmentações (m/z)			Estrutura do ião molecular
567	- 162 Da	- 190 Da		[XylAc-MeGlcA-Hex+Na] ⁺
	→ 405	→ 215		
1053	- 60 Da	- 162 Da	- 190 Da	[XylAc-MeGlcA-Hex ₄ +Na] ⁺
	→ 507	→ 345	→ 155	
699	- 342 Da	- 174 Da	- 190 Da	[Xyl ₂ Ac-MeGlcA-Hex+Na] ⁺
	→ 711	→ 537	→ 347	
861	- 364 Da	- 162 Da	- 162 Da	[Xyl ₂ Ac-MeGlcA-Hex ₂ +Na] ⁺
	→ 689	→ 527	→ 365	
699	- 60 Da	- 162 Da	- 190 Da	[Xyl ₂ Ac-MeGlcA-Hex+Na] ⁺
	→ 639	→ 477	→ 287	
861	- 162 Da	- 190 Da		[Hex ₄ -MeGlcA-H ₂ O+Na] ⁺
	→ 537	→ 347		
861	- 162 Da	- 162 Da	- 190 Da	[Xyl ₂ Ac-MeGlcA-Hex ₂ +Na] ⁺
	→ 699	→ 537	→ 347	
861	- 162 Da	- 172 Da	- 180 Da	[Hex ₄ -MeGlcA-H ₂ O+Na] ⁺
	→ 699	→ 527	→ 347	
			-162	→ 185

Para o ião com m/z 1053 foram observadas duas vias de fragmentação distintas que vão de encontro à mesma estrutura XylAc-MeGlcA-Hex₄.

Na via de fragmentação mais abundante verificou-se, inicialmente, uma perda de 342 Da (resíduo Hex-Hex_{term}), uma perda posterior de 174 Da (resíduo XylAc) e por fim uma perda de 190 Da, formando [Hex₂+Na]⁺ residual (para m/z 347) (Tabela 25 e Tabela 29).

Para o aducto com m/z 699 foram encontradas, mais uma vez, duas vias de fragmentação que o identificam como sendo um tetrassacarídeo acetilado Xyl₂Ac-MeGlcA-Hex. Na via mais abundante observou-se uma perda de 60 Da a partir do ião precursor, correspondente à perda de um grupo acetilo na forma de ácido acético, seguida de uma perda de 162 Da e outra de 190 Da, formando no final a espécie [Xyl_{res2}+Na]⁺ de

m/z 287 (Tabela 25 e Tabela 29). Esta perda de acetilo, sob a forma de ácido acético, já foi descrita na literatura para oligossacarídeos de xilana do *E. globulus* (195).

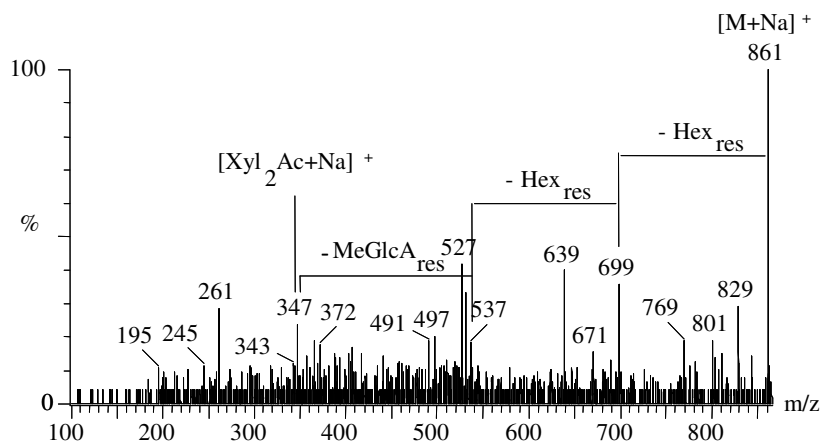


Figura 54 – Espectro de ESI-MS/MS do ião $[M+Na]^+$ de m/z : 861. Identificação da via de fragmentação mais abundante.

Identificaram-se duas estruturas possíveis para o ião a m/z 861. Para a estrutura mais abundante, que corresponde a um oligômero acetilado $Xyl_2Ac-MeGlcA-Hex_2$, observou-se a perda consecutiva de dois resíduos de hexose com formação de m/z 537. Por fim, verificou-se uma perda de 190 com formação de $[Xyl_2Ac+Na]^+$ (a m/z 347) (Tabela 29 e Figura 54). Observou-se ainda outra via de fragmentação menos abundante que pode ter origem no oligômero $Hex_4-MeGlcA-H_2O$ (Tabela 29). Foram observados também outros aductos com razões m/z : 527, 537 e 689, cujas intensidades relativas no espectro de MS foram significativas.

O ião com m/z 527 correspondeu ao trissacarídeo de hexose, Hex_3 , o ião com m/z 537 foi identificado como a espécie acetilada $Xyl_2Ac-MeGlcA$ e o ião com m/z 689 correspondeu a um tetrassacarídeo de hexose, Hex_4 .

Estes resultados comprovam que a xilana do *E. globulus* está ligada a um oligômero composto por hexosanas através de uma ligação (1→2) ao MeGlcA. No entanto, estas hexosanas podem ser glucanas ou galactanas. As enzimas utilizadas para a cisão das ligações da xilana hidrolisam em pequena extensão as ligações da glucana, podendo a ligação MeGlcA-glucana não resistir à hidrólise. Além disso, a xilana do *E. globulus* contém também ramnoarabinogalactanas contendo pequenas quantidades de ligações (1→6) (8).

Pelos resultados até aqui obtidos, tanto dos espectros de RMN como das análises de açúcares feitas (havendo uma razão de glc:gal de 6), não se consegue afirmar com toda a clareza que o oligômero ligado à xilana é uma glucana, embora tudo indicie que seja.

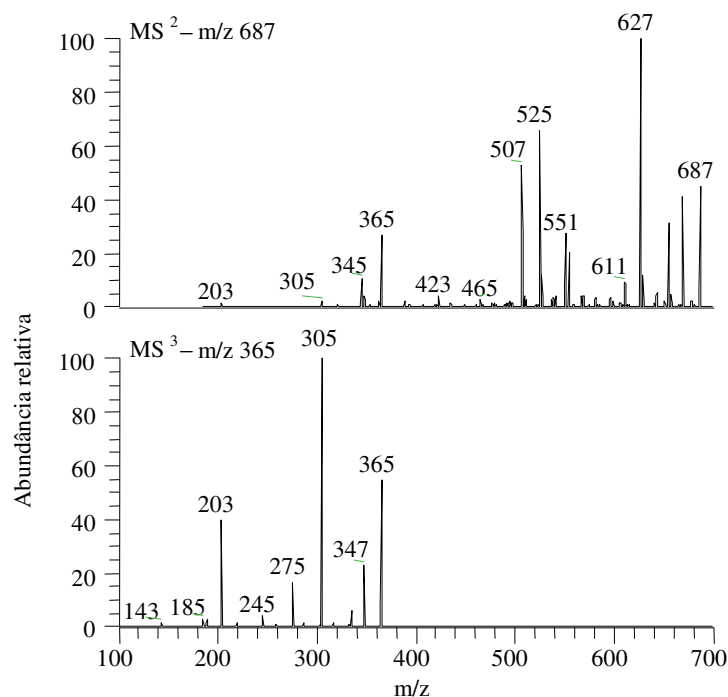


Figura 55 – Espectro de MS² e MS³ do ião com m/z 687 e m/z 365, respectivamente.

No entanto, depois de se fazer um MS³, num espectrômetro de massa de trapa de iões (do inglês “Ion trap”), ao ião com m/z 365 correspondente ao aduto [Hex₂+Na]⁺, do precursor com m/z 687 (Figura 50 e Tabela 26), observaram-se as perdas de 60 Da (m/z 305), de 90 Da (para m/z 275) e de 120 Da (para m/z 245) características da fragmentação do anel de uma hexose ligada a um resíduo vizinho por uma ligação *O*-6 (Tabela 30 e Figura 55) (197, 198).

Tabela 30 – Fragmentação do ião com m/z 687 no espectrômetro de massa de trapa de iões (MS²).

[M+Na] ⁺ (m/z)	Fragmentação (m/z)		Estrutura do ião molecular
687	- 322 Da → 365	- 162 Da → 203	[Xyl-MeGlcA-Hex ₂ +Na] ⁺

Com o intuito de esclarecer que dímero é representado pelo íon com m/z 365, foram também realizados MS² a padrões dímeros de glucose (ligações α -(1→4) - maltose e α -(1→6) - isomaltose) e de galactose (ligações β -(1→4) e β -(1→6) - galactobioses), sabendo que na madeira as glucanas maioritárias são do tipo α e as galactanas do tipo β .

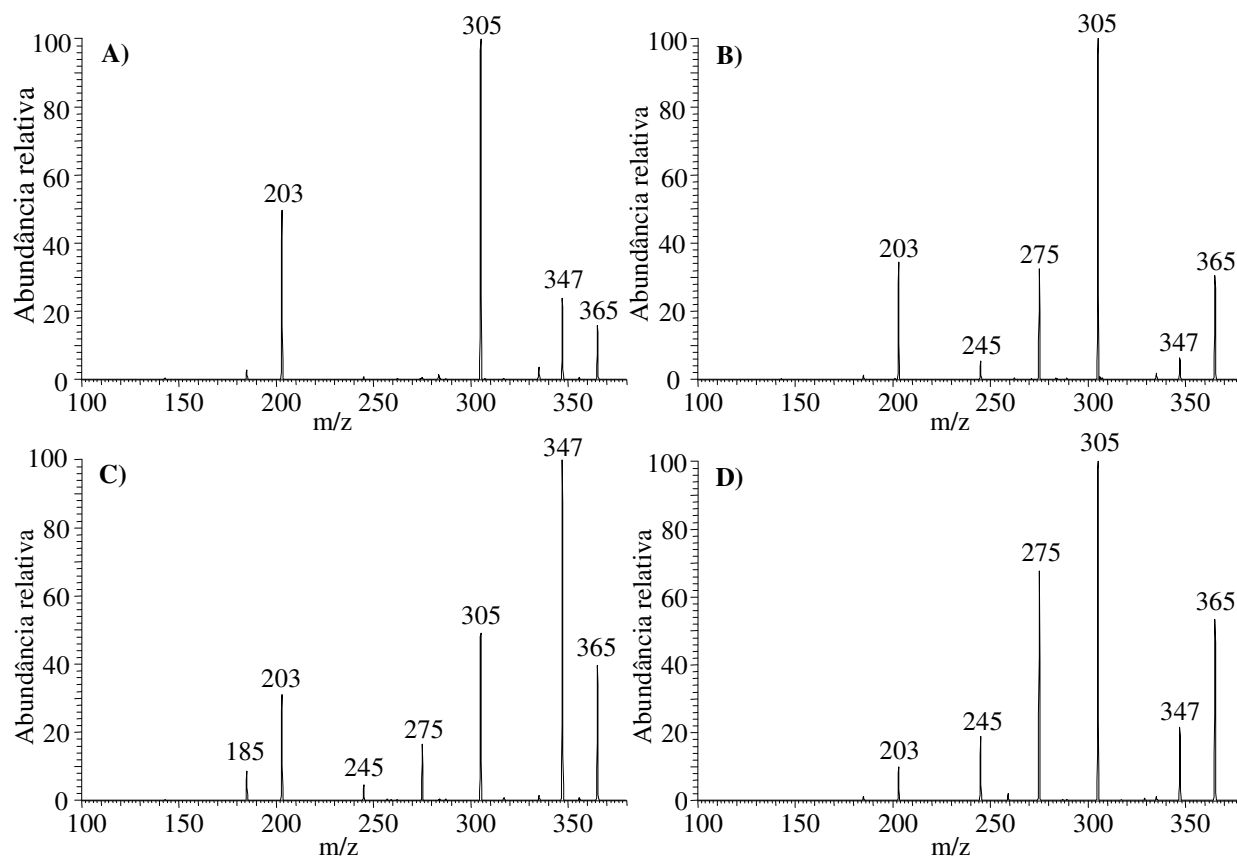


Figura 56 - Espectro de MS² dos padrões com m/z 365: A) Maltose; B) Isomaltose; C) Galactobiose β -(1→4); D) Galactobiose β -(1→6)

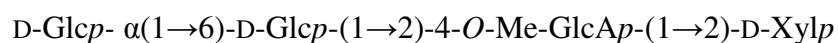
As Figura 55 e Figura 56 mostram os espectros de MS² dos dissacarídeos padrões. Verificou-se que o íon m/z 365 é idêntico ao padrão B – isomaltose, pois apresentou uma fragmentação e a abundância dos fragmentos idênticos aos deste padrão, revelando desta forma que a ligação envolvida é uma α -(1→6) e que o monossacarídeo ligado ao MeGlcA é uma glucose.

A galactobiose β -(1→6) apresentou uma fragmentação idêntica, mas o fragmento com m/z 275 tem uma abundância muito superior e o fragmento com m/z 203 uma abundância bastante inferior, quando comparados com os encontrados na isomaltose e na amostra (Figura 55).

Assim, estes últimos dados permitem confirmar e atribuir ao íão com m/z 687 o oligossacarídeo α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)-D-Glcp-(1 \rightarrow 2)-4-O-Me-GlcAp-(1 \rightarrow 2)-D-Xylp.

Conclui-se que apesar de existir alguma hidrólise durante a extracção com água e durante a purificação das amostras com ácido peracético, alguma quantidade de glucanas ligada à xilana conseguiu resistir e manteve a sua estrutura polimérica, sendo apenas degradada parcialmente durante a hidrólise enzimática.

Foi possível ainda determinar como é que a ligação entre as glucanas existentes na madeira e as xilanas ocorre. Demonstrou-se que a ligação entre a glucana e a xilana ocorre através do grupo substituinte MeGlcA, por uma ligação (1 \rightarrow 2), e que posteriormente as duas unidades consecutivas de glucose, ligadas a este ácido, estão ligadas entre si por uma ligação α (1 \rightarrow 6):



Esta ligação, que existe entre a xilana e a glucana, vem explicar as quantidades significativas de glucose encontradas nas xilanas precipitadas do licor negro. No entanto não foi possível confirmar se todo o amido, encontrado nas xilanas precipitadas do licor, estava ligado à xilana, uma vez que os fragmentos identificados por ESI-MS, ESI-MS/MS continham no máximo quatro hexoses consecutivas. As xilanas do licor, que podem precipitar na pasta, arrastam naturalmente as glucanas que lhes estão ligadas, e como tal, o efeito da precipitação das glucanas pode também ser observado.

4.2.4 Conclusões

As glucanas da madeira de *E. globulus* e da pasta foram caracterizadas, confirmando a presença de amido na madeira de *E. globulus*. Além das xilanas, a madeira de *E. globulus* contém quantidades significativas de glucanas e de glucomananas, tendo-se estimado em base madeira 2,5% de glucomananas e 4-4,5% de glucanas. Verificou-se que as glucanas são a segunda hemicelulose mais abundante da madeira de *E. globulus*. O amido (α -

glucanas) da madeira mostrou ter uma composição de 83% em amilopectina e 17% em amilose e apresenta uma abundância na madeira superior a 4%.

Os pesos moleculares médios das glucanas extraídas da madeira (8,4 kDa) e da pasta (7,3 kDa) mostraram que estas sofrem uma ligeira degradação durante o cozimento, sendo o peso molecular médio das glucanas da pasta 13% menor que o das glucanas da madeira. Esta diminuição, pouco acentuada nos valores do peso molecular médio, mostrou que existe alguma resistência por parte das glucanas à degradação alcalina.

A percentagem mássica de glucose (proveniente das glucanas e das glucomanana, em base madeira) extraída à madeira durante o cozimento deverá ser no máximo de 5-6%, tendo-se obtido valores aproximadamente constantes para tempos de extracção mais longos. Mesmo usando temperaturas mais baixas, o valor de glucose extraída, com origem nas glucanas, foi aproximadamente igual.

Na extracção da madeira com água foram obtidas quantidades significativas de glucanas, xilanas, glucomananas e também galactanas. Da pasta kraft extraíram-se principalmente glucanas, xilanas e galactanas. As glucomananas terão sido degradadas durante o cozimento, uma vez que não foram encontradas na pasta kraft em quantidades significativas (~0,2% de manose).

Identificaram-se as ligações características das α - e β -glucanas e das glucomananas nos extractos da madeira e da pasta. Confirmou-se, por RMN, a presença de α -glucose, especialmente pelo aparecimento dos picos característicos dos prótons anoméricos das unidades estruturais 4,6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow e \rightarrow 4)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow . Devido à sua grande abundância, é possível afirmar que a glucana maioritária que se encontra na madeira é uma α -glucana.

O elevado teor de xilose nas glucanas extraídas e as dificuldades encontradas no isolamento das diversas xilanas e glucanas com um grau de pureza elevado, revelaram que existe uma ligação potencialmente forte e bastante estável entre as xilanas e glucanas. Além disso, confirmou-se a presença do MeGlcA nas glucanas extraídas. Verificou-se que o MeGlcA está envolvido na ligação entre as glucanas e as xilanas pela identificação do fragmento α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)-D-Glcp-(1 \rightarrow 2)-4-O-Me-GlcAp-(1 \rightarrow 2)-D-Xylp e que a ligação que se estabelece entre eles é relativamente forte. Estes resultados justificam a dificuldade encontrada anteriormente em eliminar a glucose e a xilose residuais das amostras de xilanas e glucanas extraídas. Este resultado confirmou que as α -glucanas precipitadas do

licor negro estão ligadas à xilana, fazendo parte das suas ramificações. Não foi possível confirmar se todo o amido estava ligado à xilana, no entanto, o facto das xilanas ligadas às glucanas apresentarem uma maior solubilidade em soluções aquosas e no licor negro, evidencia que o amido poderá estar ligado às xilanas em grande extensão.

Os resultados de caracterização das glucanas e o seu perfil de extracção durante o cozimento demonstraram a importância desta hemicelulose. A ligação que se estabelece entre as glucanas e xilanas foi comprovada pela primeira vez e explica a precipitação conjunta de xilanas e glucanas. As glucanas podem assim ter um papel importante no aumento de rendimento da pasta kraft, visto poderem ser precipitadas conjuntamente com as xilanas e contribuir para esse aumento.

4.3 ESTUDOS DE PRECIPITAÇÃO DE XILANAS

Ao longo deste trabalho foi visto que as xilanas que se dissolvem no licor negro apresentam características estruturais que permitem a sua recuperação e precipitação. Esta precipitação tem uma importância acrescida se for feita nas pastas kraft pelo interesse que este facto pode trazer à indústria.

O objectivo principal desta fase do trabalho foi compreender a precipitação das xilanas no fim da fase residual e clarificar quais são os principais parâmetros que influenciam essa mesma precipitação.

4.3.1 *Precipitação durante o cozimento kraft – Variação das condições processuais*

4.3.1.1 Resultados dos cozimentos realizados

Resultados publicados apontam para o facto de a precipitação das xilanas na pasta ocorrer essencialmente no fim do cozimento, quando se verifica um abaixamento do pH do meio (99, 122, 123, 130, 131). Para verificar este facto realizaram-se vários cozimentos com tempos e condições de alcalinidade diferentes. Desta forma pretendia-se estudar a influência destes dois parâmetros na precipitação das xilanas, determinar o momento em que as xilanas precipitam e a que alcalinidade este efeito é mais visível. Estes cozimentos foram realizados num reactor *batch* de circulação forçada.

Dos vários cozimentos realizados foi determinado o rendimento final total, o teor de incozidos e o IK. Os resultados obtidos nos vários cozimentos realizados estão descritos nas várias tabelas (Tabela 31-Tabela 33).

Confirmou-se que, com o aumento do tempo de cozimento e com o aumento de alcalinidade, o rendimento total diminui. Não se conseguiu observar um aumento claro de rendimento total resultante da precipitação das xilanas na parte final do cozimento (Tabela 31).

Tabela 31 – Rendimento total dos cozimentos realizados a vários tempos de patamar com AA = 12%, 14%, 15% e 17% e IS = 28%.

Alcali activo, %	Tempo de patamar (min)						
	35	40	50	65	80	100	120
12					58,0		56,8
14		57,1	56,9	55,7	55,3	55,2	55,1
15			55,6	55,1	55,3	54,5	
17	55,2		54,7		54,0		

Outro factor a ponderar é o teor de incozidos. O uso de alcalinidades mais baixas e tempos de cozimento menores resulta em menores graus de degradação dos polissacarídeos e como tal numa maior capacidade de precipitação. No entanto, as baixas alcalinidades originam também uma diminuição do rendimento em pasta crivada, como resultado do aumento da quantidade de incozidos. Assim, não se conseguiu observar o aumento de rendimento caso a precipitação tenha ocorrido. Verificou-se que tempos de cozimentos e alcalinidades mais baixos resultaram em teores de incozidos superiores (Tabela 32). Observou-se uma diminuição acentuada na percentagem de incozidos no final do cozimento quando se aumentou a alcalinidade de 12% para 14% e o tempo de cozimento de 50 para 65 minutos (Tabela 32).

Tabela 32 – % de incozidos resultantes dos cozimentos realizados a vários tempos de patamar com AA = 12%, 14%, 15% e 17% e IS = 28%.

Alcali activo, %	Tempo de patamar (min)						
	35	40	50	65	80	100	120
12					4,2		2,1
14		2,4	1,9	0,9	0,7	0,2	0,2
15			1,0	0,4	0,5	0,1	
17	1,8		0,6		0,2		

Os rendimentos em pasta crivada (calculados como a diferença entre o rendimento total e a percentagem de incozidos) também não permitiram concluir se a precipitação das xilanas ocorreu. Os valores obtidos mostraram ser muito próximos e sem um comportamento bem definido. O facto de se utilizar tempos de cozimento superiores, pode

resultar em valores de pH mais baixos e provocar a precipitação das xilanas, no entanto, o facto de se estar a prolongar o cozimento resulta também em um maior grau de degradação, podendo contrabalançar a precipitação. Nos cozimentos efectuados, mesmo empregando baixas cargas alcalinas, não foi possível observar o fenómeno de precipitação.

O índice kappa no final do cozimento é um parâmetro importante na caracterização das pastas e é bastante influenciado pelas condições de cozimento (tempo de cozimento e alcalinidade do licor de cozimento). Esta influência pode ser observada pela Tabela 33, que mostrou que o IK diminuiu com o aumento da alcalinidade e com o aumento do tempo de cozimento. Tal como foi visto no teor de incozidos, existe uma clara diminuição de IK quando se aumentou a alcalinidade do licor de cozimento de 12% para 14% e o tempo de cozimento para 65 minutos.

Tabela 33 – Índice kappa das pastas resultantes dos cozimentos realizados a vários tempos de patamar com AA = 12%, 14%, 15% e 17% e IS = 28%.

Alcali activo, %	Tempo de patamar (min)						
	35	40	50	65	80	100	120
12					20,2		15,7
14		19,3	16,9	14,7	13,4	12,2	12
15			14,6	12,7	13	11,4	
17	17,9		13,8		12,8		

Estes resultados iniciais dos cozimentos, e nas condições estudadas, não permitiram concluir se existe precipitação das xilanas no final do cozimento. Para perceber se o fenómeno de precipitação ocorreu caracterizaram-se também as pastas resultantes dos cozimentos anteriores. Pretendia-se verificar se as diferenças encontradas as pastas permitem obter alguma informação relativa à precipitação das xilanas no final do cozimento.

4.3.1.2 Análise da composição em monossacarídeos nas pastas

Foi determinada a composição em monossacarídeos das pastas produzidas. Procurou-se verificar se houve, em algum momento do cozimento, um aumento da retenção de xilose na pasta (que resultaria da precipitação das xilanas). Considerando a massa de pasta sem lenhina, consegue-se chegar aos valores aproximados de xilose, galactose e glucose (os açúcares maioritário) em base madeira (m/m, madeira a. s.). Estes resultados estão resumidos na Figura 57. A correcção em lenhina foi feita através da Equação 16 (capítulo 4.1.3), mencionada na literatura para as pastas kraft do *E. globulus* (39).

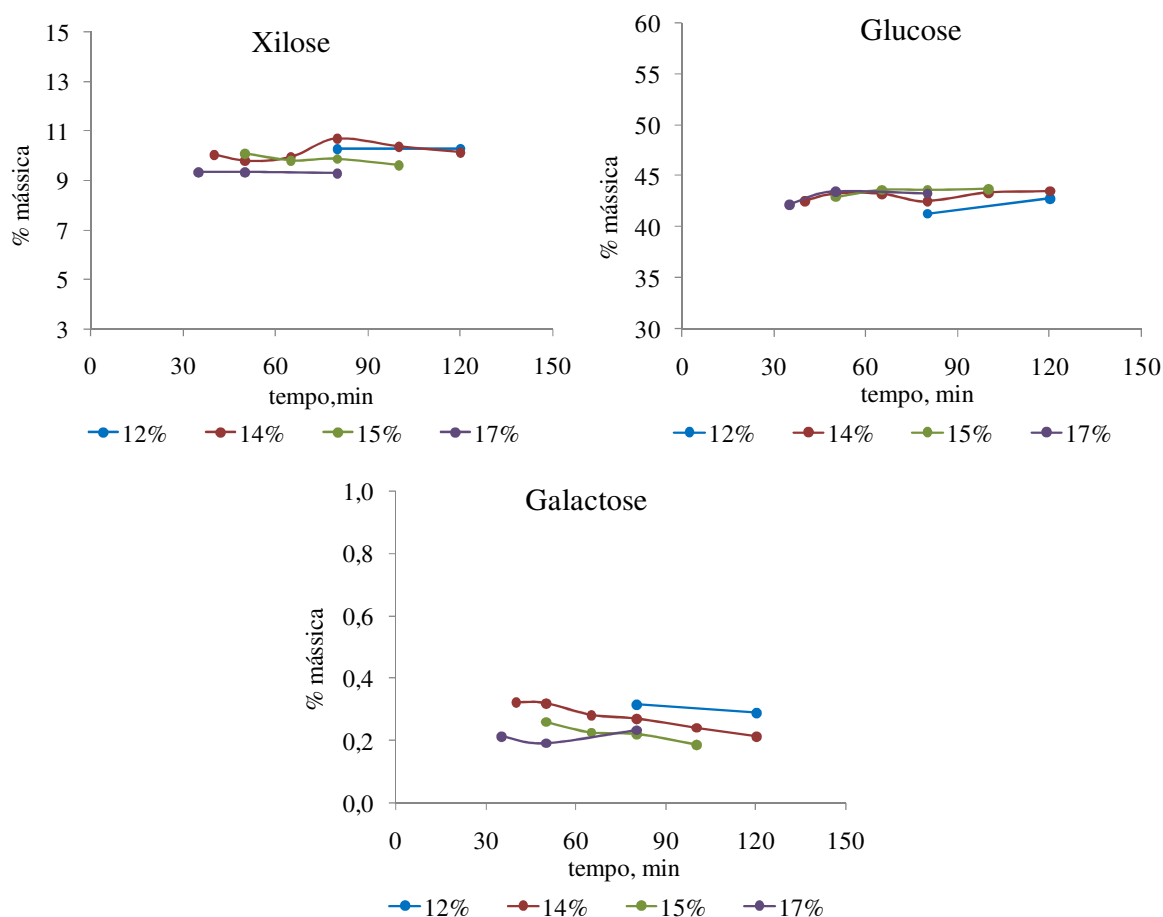


Figura 57 - Composição nos monossacarídeos principais das pastas resultantes dos cozimentos realizados a várias alcalinidades (% m/m, base madeira a.s.)

A variação da quantidade de xilose e de glucose nas pastas é muito pequena e varia essencialmente devido à diferença de alcalinidade e não ao aumento do tempo (como se

poderia esperar de uma eventual precipitação na fase final do cozimento). A composição da pasta em galactose é o que, aparentemente, mais sofreu influência do tempo e da alcalinidade do licor de cozimento. Com o prolongamento do tempo de cozimento e com o aumento da alcalinidade do licor de cozimento, a composição da pasta em galactose diminuiu, resultado da maior degradação da fracção de galactanas existente na pasta. Os resultados obtidos na análise aos monossacarídeos da pasta também não foram conclusivos.

Uma vez que a composição das pastas não mostra a precipitação das xilanas decidiu-se pesquisar a superfície das fibras. A análise aos monossacarídeos por hidrólise ácida e posterior medição dos acetados de alditol por cromatografia gasosa mede a composição total da pasta. Este método pode ter pouca sensibilidade para detectar a precipitação que ocorre na superfície, especialmente se for em pequena escala. Assim recorreu-se ao peeling enzimático para estudar as camadas mais superficiais das fibras das pastas.

4.3.1.3 Peeling enzimático

O *peeling* enzimático e posterior análise por HPLC é uma técnica que permite quantificar a composição em monossacarídeos a vários graus de profundidade das fibras. O peeling enzimático permite trabalhar as fibras por camada, consoante o tempo de contacto que as fibras estão com as enzimas, conseguindo-se uma hidrólise selectiva e com diferentes graus de penetração da fibra (125) (ver procedimento no capítulo 3.5.10). A quantidade e a composição de monossacarídeos obtidas a menores tempos de contacto entre a solução e as fibras correspondem naturalmente à superfície da fibra.

Os resultados obtidos por *peeling* enzimático mostraram que não há grande variação na composição das várias pastas, tanto na superfície da fibra como no interior da fibra (Figura 58). Verificou-se que no período inicial do tratamento enzimático, o material sacarínico removido é composto por 50-60% de xilose, evidenciando um enriquecimento de xilanas à superfície das fibras. À medida que o tempo de hidrólise enzimática avançou, a remoção de material sacarínico foi aumentando e o teor de xilanas diminuiu para valores aproximados de 20%, correspondentes aos valores típicos na pasta total. As pastas apresentaram-se mais ricas em xilose na superfície das fibras que no interior destas.

Observou-se uma pequena variação na composição nas diferentes pastas, no entanto, verificou-se que essa variação tendeu a desaparecer com o tempo de *peeling* e com a massa total retirada. As diferenças observadas não apresentaram nenhuma tendência evidente e não são suficientes para se concluir acerca da precipitação ao longo do cozimento.

Na literatura é possível encontrar referência a este enriquecimento da superfície em xilose. As xilanas desacetiladas que se dissolvem no início voltam a depositar-se na superfície das fibras, ficando estas mais ricas em xilose na superfície (74). Foi observada nas pastas analisadas a razão entre a glucose e a xilose um valor próximo de 1, mas este resultado não permite perceber se houve deposição de xilanas visto observar-se esta razão ao longo de todo o cozimento.

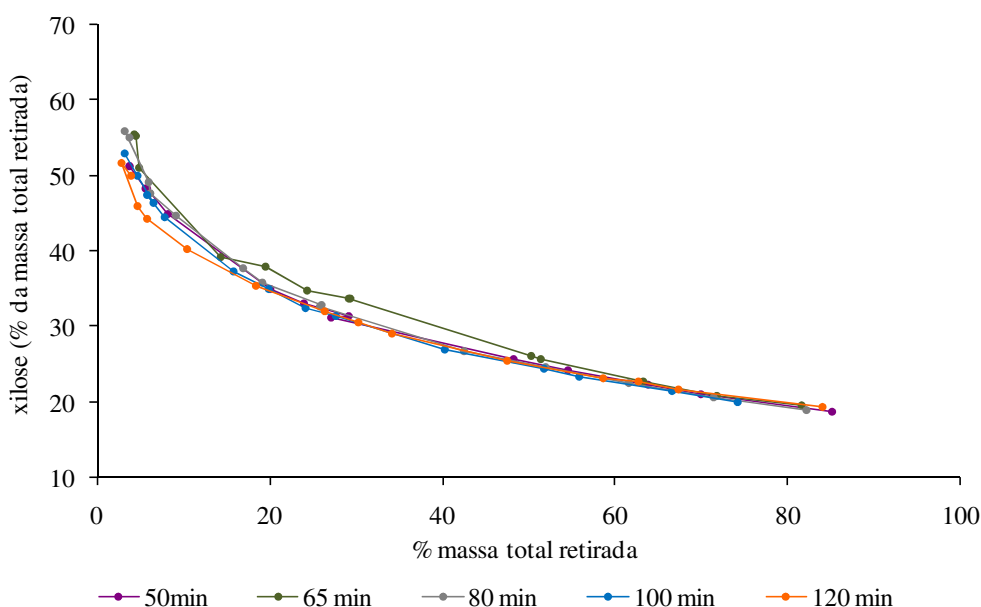


Figura 58 – Perfil da quantidade de xilanas retiradas por *peeling* enzimático das fibras das pastas kraft convencionais resultantes do cozimento com AA = 14% e IS = 28%.

Mais uma vez, os resultados obtidos até aqui não permitiram tirar conclusões inequívocas sobre a precipitação ao longo do cozimento.

4.3.2 Precipitação em pastas kraft cruas por abaixamento do pH do licor negro

Nos testes realizados anteriormente não se conseguiu obter respostas acerca da precipitação. O factor apontado como preponderante na precipitação de xilanas no final do cozimento é o abaixamento do pH. Sabendo isto, procedeu-se a um estudo da influência do pH neste processo.

Para estudar o efeito do pH foram realizados vários ensaios num reactor com controlo de temperatura, pressão atmosférica e sob agitação contínua, onde foi induzida a precipitação em várias pastas, por abaixamento do pH do licor negro, com adição de quantidades crescentes de ácido sulfúrico (Tabela 34). O ácido sulfúrico foi adicionado ao reactor, contendo pasta kraft (30 g a.s.) e licor negro (500 ml), ao fim de 50 minutos e a uma temperatura aproximada de 80°C, tendo-se deixado reagir durante mais 15 minutos (ver procedimento completo no capítulo 3.5.1). Depois de as pastas serem filtradas e lavadas, esperava-se obter diferentes graus de precipitação consoante o valor do pH final do licor negro. Foi utilizado o licor negro como fonte de xilanas e usada a pasta correspondente (alcali activo de 14% e tempo de patamar de 65 minutos). O licor negro utilizado nestes ensaios apresenta um pH de 12,8.

No final de cada ensaio foi determinado o teor de cinzas e o IK das pastas produzidas e foi medido o pH do licor final. Foi realizado um ensaio em branco onde não foi adicionada ácido, apenas água, de forma a poder controlar o real efeito da adição do ácido. As várias pastas foram identificadas através do pH do licor final correspondente, sendo a pasta de partida a que corresponde ao pH de 12,8 e a pasta obtida no ensaio em branco a que corresponde ao pH de 12,7.

O aumento em massa devido à precipitação de xilanas foi calculado pela diferença entre o aumento em massa total com a precipitação e o aumento da quantidade de lenhina (calculada através da Equação 16, parte experimental – capítulo 4.1.3). O teor de cinzas de todas as pastas produzidas foi inferior a 1%, não influenciando os resultados aqui descritos.

No ensaio em branco, correspondente à adição de apenas água, observou-se um ligeiro abaixamento de pH do licor para 12,7. Neste ensaio verificou-se também um aumento de massa total, resultado do aumento em massa de lenhina na pasta mas também do aumento em massa de xilanas.

Tabela 34 – Resultados da precipitação por abaixamento do pH. A pasta de partida (sem precipitação) é a que apresenta o pH no licor de 12,8.

pH do licor	Vol. de ácido adicionado *	IK	Aumento em massa total com a precipitação, %	Aumento em massa devido à precipitação de xilanas, %
12,8	-----	12,9	-----	-----
12,7	0	14,1	1,5	1,3
12,0	2	14,1	0,8	0,5
11,7	2,4	15,2	1,7	1,2
11,5	2,7	14,8	2,3	1,9
11,3	3,2	14,8	2,2	1,8
11,0	4,0	15,5	1,9	1,3
10,7	5,0	18,3	1,9	0,8
10,5	6,5	19,4	2,2	0,9

* O volume total adicionado foi de 20 ml, tendo sido perfeito o volume total com água.

Com a adição de ácido verificou-se um abaixamento do pH de 12,8 até uma gama de pH no licor negro que variou entre 10 e 12 (Tabela 34). Observou-se um aumento de massa contínuo de xilana nas pastas, onde foi induzida a precipitação, até um máximo de 1,9% de ganho de massa, atingido na pasta correspondente ao licor 11,5. A partir deste ponto verificou-se uma diminuição na percentagem de xilana precipitada (Tabela 34 e Figura 59).

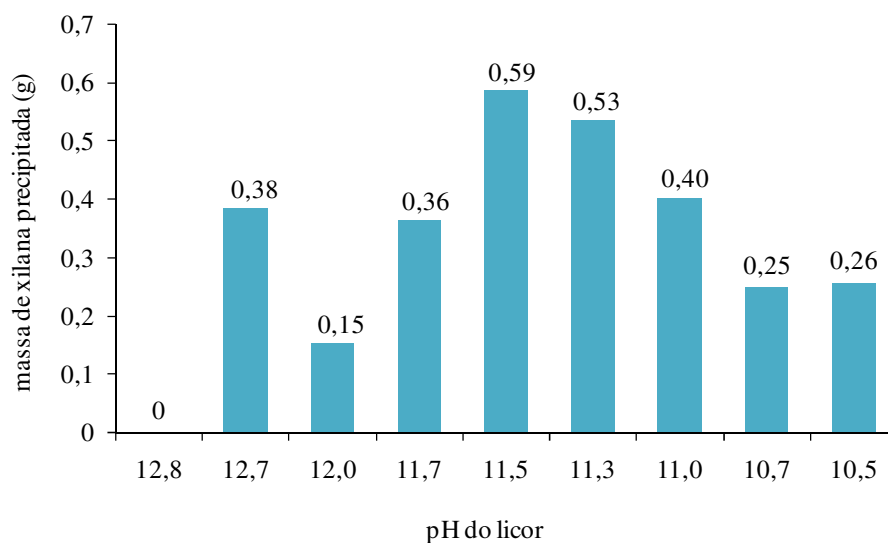


Figura 59 – Perfil da precipitação de xilanas com a diminuição do pH do meio reaccional.

O ensaio sem a adição de ácido resultou num aumento de massa superior ao aumento verificado nos dois ensaios com pH imediatamente abaixo. O efeito observado neste ensaio não foi esperado, dever-se-ia verificar um aumento de massa muito menos significativo.

Com a diminuição do pH, observou-se uma precipitação simultânea de lenhina. Verificou-se, pela Figura 60, que o abaixamento do pH resultou num aumento contínuo da precipitação de lenhina e que para pH inferiores a 11,3 existiu uma precipitação mais acentuada. Esta maior precipitação, para $\text{pH} < 11,3$ pode ser explicada pela protonação dos grupos fenólicos e consequente diminuição da solubilidade da lenhina do licor negro.

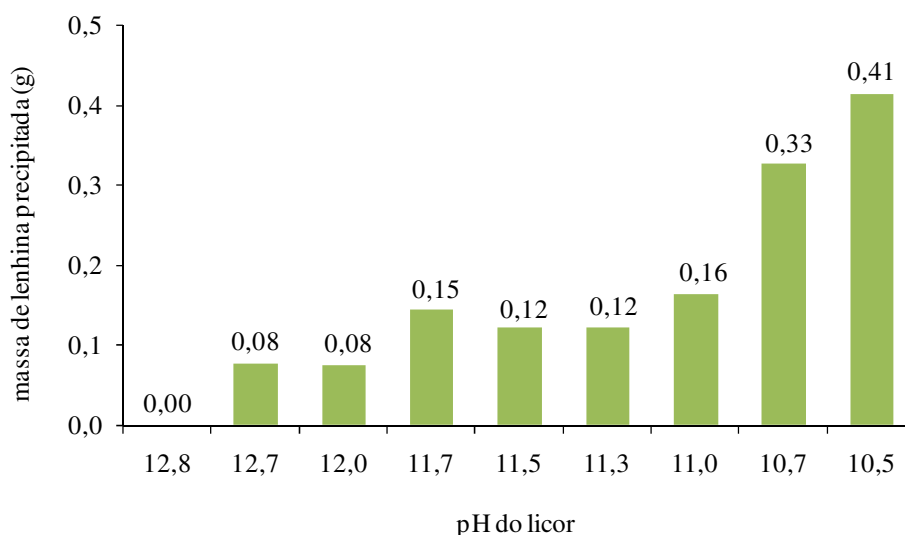


Figura 60 – Perfil da precipitação da lenhina com a diminuição do pH do meio reaccional.

A precipitação das xilanas ocorreu aparentemente de uma forma ligeira, sem que tenha havido uma precipitação muito acentuada para pHs mais baixos. Para valores de pH mais baixos observou-se uma ligeira diminuição na quantidade de xilana precipitada, que pode ter sido provocada pela precipitação da lenhina, que cria uma barreira física à deposição das xilanas. Além disso, nesta gama de pHs, existe um balanço entre a solubilidade das xilanas, que diminui com pH, aumentando a quantidade de xilana precipitada, e o intumescimento, que diminui com o pH, dificultando a difusão e a absorção das xilanas nas fibras da pasta.

Pelos resultados obtidos verificou-se a existência de uma zona mais selectiva para a precipitação das xilana, no intervalo de pHs 11,0-11,7. Para valores de pH inferiores a 11,0 a lenhina co-precipita com a xilana em quantidades significativas, resultando em problemas ao nível da branqueabilidade das pastas. Pastas com alto teor em lenhina necessitam do uso de maiores quantidades de reagentes e dificultam o acesso dos reagentes ao interior das fibras.

4.3.2.1 Caracterização das xilanas das pastas

Para perceber a precipitação, era importante estudar apenas as xilanas que precipitavam, isto é, as que se encontram apenas na superfície das fibras. Para tal, foram efectuadas extracções com uma solução alcalina (KOH 10%), empregando tempos de extracção de apenas 17 min, em vez das duas horas de extracção usadas normalmente, de forma a extrair apenas as xilanas depositadas na superfície da fibra. Tempos de extracção superiores permitem uma maior difusão da solução alcalina para o interior das fibras e uma remoção de xilanas mais extensa nesta região.

Verificou-se que o rendimento da extracção das xilanas é idêntico aos obtidos nas extracções de 2 horas (Tabela 18 e Tabela 35).

Tabela 35- Rendimento das extracções das xilanas das pastas onde foi induzida a precipitação e na pasta de partida (a que corresponde ao licor inicial de pH 12,8).

pH do licor	Rendimento, %
12,8	16,9
12,7	12,8
12,0	16,7
11,7	16,3
11,5	16,5
11,3	----
11,0	17,1
10,7	17,2
10,5	----

Os rendimentos obtidos nas diferentes extracções foram idênticos, não sendo possível observar um comportamento ou uma tendência com a diminuição do pH do licor. Esperava-se obter um aumento da quantidade de xilana extraída nas pastas onde a precipitação fosse mais evidente.

4.3.2.1.1 Análise da composição em monossacarídeos

A caracterização em açúcares das xilanas extraídas das diferentes pastas não revelou grandes diferenças nas suas composições. Existe uma diferença, embora pouco significativa, da pasta inicial (pH do licor = 12,8) para todas as outras pastas (Tabela 36). Verificou-se que a composição das xilanas precipitadas é diferente da existente na pasta inicial (Tabela 36). A xilana da pasta de inicial apresentou-se ligeiramente mais rica em xilose e apresentou um teor de glucose um pouco menor do que as outras xilanas. Este facto é explicado pela precipitação das xilanas do licor que, como se viu, são mais ramificadas e apresentam teores de glucose superiores (Tabela 12 e Tabela 20).

Tabela 36 – Composição das xilanas extraídas das pastas onde foi induzida a precipitação (% dos açúcares principais, normalizada).

pH do licor	Xilose	Galactose	Glucose
12,8	96,7	2,0	0,8
12,7	96,5	1,8	1,3
12,0	96,6	1,9	1,1
11,7	96,4	1,8	1,5
11,5	96,4	1,8	1,4
11,0	96,4	1,9	1,3
10,7	96,5	1,9	1,3

Estes primeiros resultados indiciam uma ligeira precipitação das xilanas do licor sobre a superfície das pastas. No entanto são pouco conclusivos devido aos baixos valores de precipitação que se observaram. Nestes primeiros resultados não se observou uma clara

influência do pH na precipitação das xilanas. Para tentar confirmar estes resultados caracterizaram-se mais detalhadamente as pastas.

4.3.2.2 Caracterização das pastas

Para a caracterização das pastas foi determinada a composição em monossacarídeos, a composição em lenhina e ácidos hexenurónicos e o teor de grupos carboxílicos. Foram ainda caracterizadas as superfícies das pastas por ESCA e TOF-SIMS e realizou-se ainda uma análise por peeling enzimático de forma a perceber o grau de penetração das xilanas retidas.

4.3.2.2.1 Análise da composição em monossacarídeos

A composição em monossacarídeos das pastas produzidas está descrita na Tabela 37. Observou-se uma variação significativa entre a pasta de partida (a correspondente ao licor negro inicial com pH = 12,8) e as outras pastas, onde houve o aumento de aproximadamente 1,2% no teor de xilose.

Tabela 37 – Composição em monossacarídeos das pastas onde foram precipitadas as xilanas aos diferentes valores de pH no licor.

pH no licor	Xilose	Glucose	Galactose
12,8	16,4	82,6	0,6
12,0	17,7	81,4	0,6
11,5	17,8	81,2	0,6
11,3	17,6	81,5	0,6
11,0	17,3	81,8	0,6
10,7	17,3	81,8	0,6
10,5	17,8	81,2	0,6

A composição em galactose manteve-se constante (0,6%) com a variação do pH do licor, e a composição em glucose descreveu o comportamento inverso ao observado para a xilose. Deste facto conclui-se que o aumento do teor de xilose resulta essencialmente da precipitação das xilanas na superfície das fibras.

4.3.2.2.2 Determinação dos teores de lenhina e de ácido hexenurónico

As glucuronoxilanas têm na sua constituição ramificações de ácido 4-O-metilglucurónico (Figura 10). Este, durante o cozimento, sofre uma desmetoxilação pela β -eliminação do grupo metoxilo formando o ácido hexenurónico (4-deoxi- β -L-threo-hex-4-enopiranosilurónico) (105).

Um aumento da quantidade de HexA nas pastas pode representar um aumento da quantidade de glucuronoxilanas como resultado da precipitação destas na superfície das fibras. Assim, outra forma de se seguir a precipitação das xilanas nas pastas é através da determinação de quantidade de HexA.

Com o intuito de seguir e confirmar esta precipitação determinou-se o teor de HexA através da dissolução das pastas em cadoxeno e posterior leitura no UV-VIS (ver procedimento no capítulo 3.5.6). Uma vez que o HexA e a lenhina absorvem ambos aos comprimentos de onda máximo de cada uma das espécies, foi necessário entrar com a contribuição da lenhina nestes cálculos (da Equação 9 à Equação 12 – Parte experimental, capítulo 3.5.6). Com a diminuição do pH do meio ocorreu naturalmente a precipitação da lenhina, e este método permitiu confirmar também essa mesma precipitação.

Verificou-se que a quantidade de HexA nas pastas variou de forma semelhante à quantidade de xilana precipitada na pasta (Figura 59 e Figura 61). Houve um aumento contínuo do teor de HexA nas pastas até ao pH 11,5, a partir do qual se observou uma diminuição, confirmando a precipitação de xilanas e o seu perfil de precipitação. Contudo, não se verificou o aumento acentuado de massa de xilana observado no ensaio em branco (pH = 12,7). O resultado descrito aqui faz mais sentido, confirmando um aumento gradual de xilana nas pastas com o abaixamento do pH.

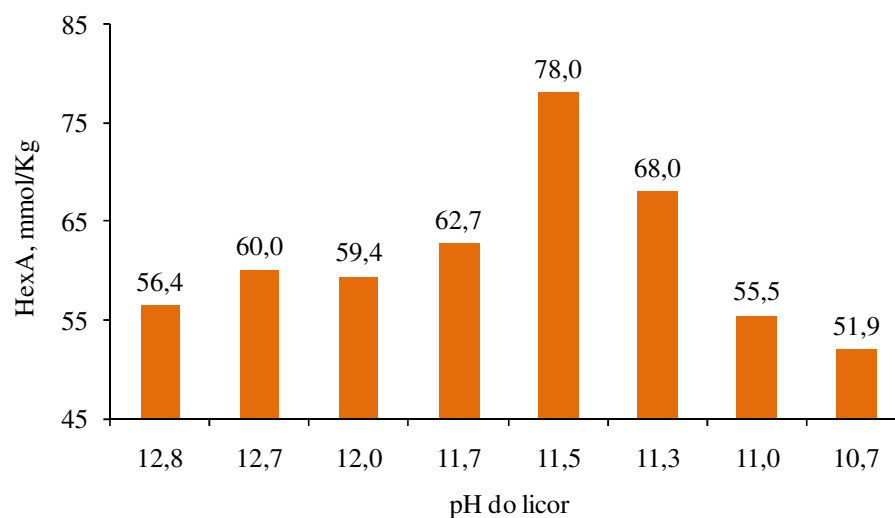


Figura 61 – Quantidade de HexA nas pastas onde foi induzida a precipitação de xilanas.

Observou-se, como já era esperado, que a diminuição do pH do meio favoreceu uma precipitação ligeira da lenhina (Figura 62), embora os resultados obtidos por este método não apresentem o mesmo perfil de precipitação obtido anteriormente (Figura 60). Os resultados obtidos anteriormente, através da determinação do IK, mostraram um aumento mais significativo do teor de lenhina, especialmente para $\text{pH} < 11,3$.

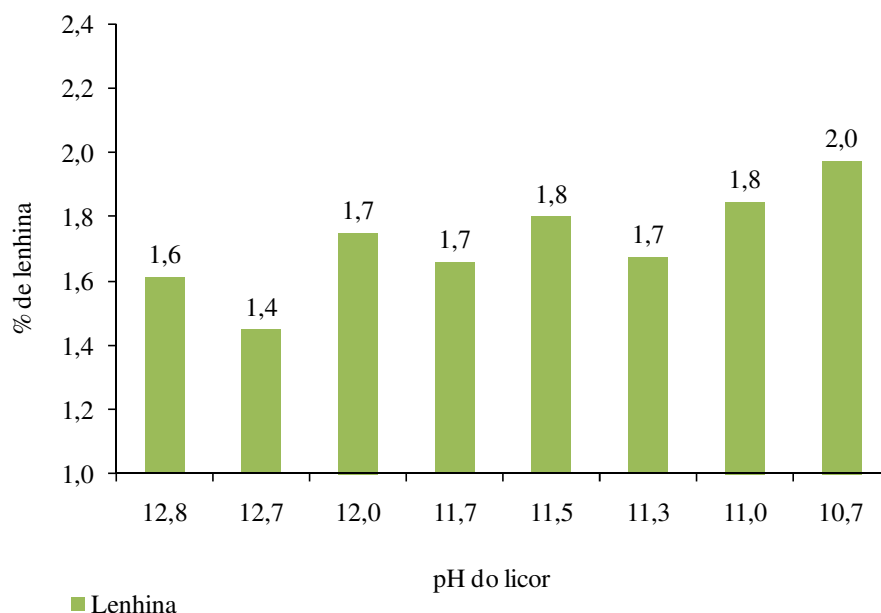


Figura 62 – Percentagem de lenhina nas pastas onde foi induzida a precipitação de xilanas. Variação da percentagem de lenhina com a diminuição do pH no licor.

A determinação do teor de lenhina com cadoxeno foi concebida com a lenhina residual que permanece na pasta. A lenhina que precipita nestes ensaios é uma lenhina mais condensada, visto a precipitação resultar do abaixamento brusco de pH e para valores relativamente mais baixos que os que se observam no cozimento. Desta forma, e uma vez que a lenhina determinada não é exactamente igual à lenhina residual das pastas, os coeficientes de absorvidade utilizados podem não ser os mais correctos.

Estes resultados mostram ainda que, nas condições deste estudo, este método pode não ser suficientemente sensível para detectar as pequenas variações observadas na precipitação da lenhina.

4.3.2.2.3 Determinação dos grupos carboxilos

Como acontecia com a determinação dos ácidos hexenurónicos nas pastas produzidas, a determinação do perfil da concentração de grupos carboxilos destas mesmas pastas pode ajudar a confirmar a precipitação das xilanas na pasta, visto as xilanas possuírem grupos substituintes de MeGlcA e HexA e a sua precipitação causar o aumento do teor de grupos carboxílicos.

A determinação do teor de grupos carboxilos nas diferentes pastas foi feita através do método descrito em (177), com ligeiras alterações (ver procedimento no capítulo 3.5.7). A concentração de grupos carboxilos [COOH] foi determinada através da Equação 13 (Parte experimental, capítulo 3.5.7).

Verificou-se um aumento da concentração de grupos carboxilos da pasta de partida (pH = 12,8) para as outras pastas (Figura 63). Este dado revelou haver um aumento de xilana logo na primeira reacção, sem adição de ácido. O perfil de retenção de xilanas obtido nestes ensaios foi semelhante ao observado na análise de açúcares (Tabela 37). Verificou-se que com a diminuição do pH do licor, a concentração de ácido diminuiu gradualmente. Isso pode ser explicado pela maior degradação dos ácidos urónicos para pH mais baixos.

Embora o aumento na concentração de grupos carboxilos não seja muito significativo, este resultado pode indicar que houve efectivamente uma precipitação de

xilanas nas pastas, visto o grupo ácido ser proveniente destes polissacarídeos. Os vários resultados obtidos indicam que o abaixamento do pH provoca uma precipitação de xilanas em pequena escala.

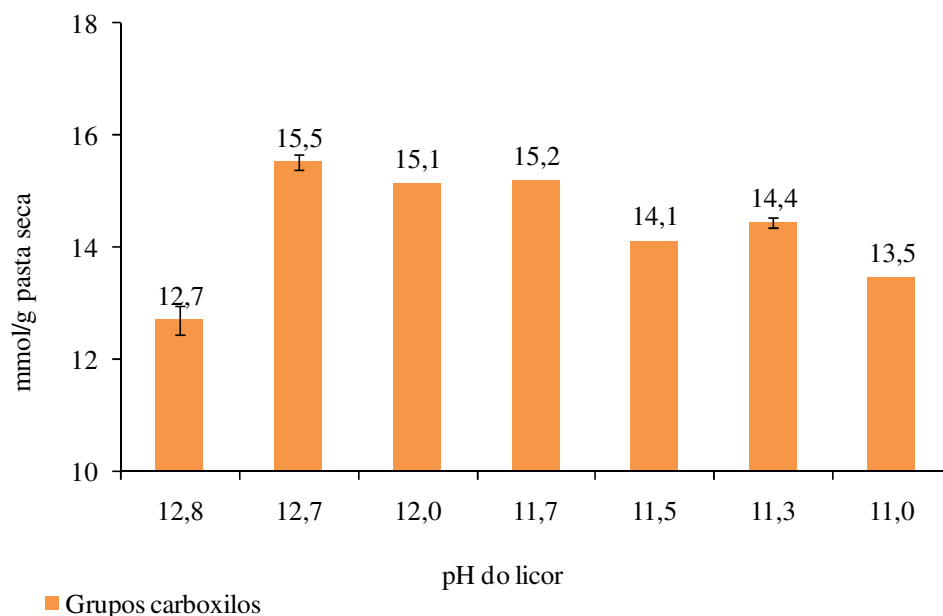


Figura 63 – Concentração de grupos carboxilos nas pastas produzidas.

Uma vez que se pensa que a precipitação das xilanas se dá maioritariamente à superfície das fibras, pensou-se em utilizar técnicas avançadas de análise de superfície (TOF-SIMS e ESCA), que permitam estudar a composição elementar da superfície das fibras. Estes dois métodos podem fornecer bastante informação sobre a superfície das fibras. Enquanto o TOF-SIMS fornece uma informação qualitativa da superfície da fibra, o ESCA (ou XPS) consegue fornecer informação semi-quantitativa da lenhina e dos hidratos de carbono existentes na superfície destas. Existem já vários trabalhos realizados na superfície de pastas, cuja caracterização é feita através destas técnicas (199).

4.3.2.2.4 ESCA ou XPS

A Espectroscopia fotoelectrónica de raio-X (ESCA ou XPS) permite determinar a composição elementar semi-quantitativa da superfície dos materiais. Além disso, permite

obter informação sobre o ambiente químico de cada elemento. Nesta técnica a amostra é irradiada com raio-X monocromático, causando a emissão de fotoelectrões da superfície. O analisador mede a energia de ligação dos fotoelectrões libertados, e através desta energia e da sua intensidade identifica o elemento atómico correspondente. Esta técnica permite obter informação da superfície até um máximo de 5 nm de profundidade. (200)

Foram analisadas por XPS as pastas resultantes dos ensaios com pH do licor final de 11,5, de 11,3, de 11,0 e a pasta de partida (que corresponde ao licor com um pH de 12,8). Por XPS de baixa resolução foi possível detectar, naturalmente, o carbono e o oxigénio como os elementos principais das amostras analisadas.

A razão Oxigénio/Carbono (O/C) permite seguir as variações existentes na superfície. Um incremento ou um decréscimo desta razão pode resultar, por exemplo, da precipitação de lenhina. No caso das amostras analisadas a razão O/C não deveria vir muito alterada, visto a xilana e a celulose apresentarem estruturas semelhantes, com os mesmos grupos funcionais principais. Verificou-se que o valor da razão O/C não variou de forma significativa (Tabela 38), indiciando que não houve deposição acentuada de lenhina sobre as fibras.

Tabela 38 – Resultados de XPS da superfície das pastas não extraídas e extraídas.

Pasta do licor pH	O/C	C1	C2	C3	C4
Não extraídas					
12,8	0,5	33,9	42,7	22,0	1,4
11,5	0,6	29,1	50,0	19,1	1,9
11,3	0,6	31,4	46,9	17,0	4,7
11,0	0,6	37,4	42,1	18,0	2,6
Extraídas					
12,8	0,8	20,3	58,1	17,3	3,8
11,5	0,8	23,0	57,1	17,1	2,7
11,3	0,7	---	---	---	---
11,0	0,8	20,5	57,5	17,4	4,6

Por XPS de alta resolução foi possível identificar a contribuição de cada um dos vários tipos de ligação, entre o carbono e o oxigénio, que as amostras apresentam à superfície (C1 – ligações C-H e C-C, C2 – ligação C-O, C3 – ligações C=O e O-C-O e C4 – ligação O-C=O). As variações destas contribuições permitem obter informações sobre as alterações estruturais e quantificar essas mesmas alterações. Os valores obtidos para o pico referente às ligações C4 não deram indicação de ter havido precipitação de xilanas na superfície, visto não terem sido observadas variações consideradas relevantes, tendo em conta as limitações deste método. Um aumento claro da banda C4 resultaria do aumento de ácidos urónicos provenientes da precipitação das xilanas ramificadas. As pequenas variações que foram observadas nas diferentes bandas, resultantes da desconvolução dos picos, não forneceram a informação que se procurava. A variação do teor de ácidos urónicos nas amostras analisadas mostrou não ser suficiente para que se verifique uma variação detectável na banda C4.

Este método revelou não ser adequado para a análise destas amostras, uma vez que as xilanas e a celulose apresentarem estruturas semelhantes e as variações no teor de xilana retida na superfície das fibras não serem suficientemente elevadas de forma a serem detectadas por esta técnica.

4.3.2.2.5 ToF-SIMS

A espectrometria de massa de iões secundários por tempo de voo (TOF-SIMS) é uma técnica que fornece informação qualitativa da superfície da pasta. Nesta técnica, a superfície da amostra é bombardeada com um feixe de um ião primário, resultando em átomos ou fragmentos de átomos carregados positiva ou negativamente, característicos da superfície do material. São estes iões que são identificados e analisados por espectrometria de massa. Esta técnica permite analisar a superfície da amostra até uma profundidade aproximada de 1 nm (200).

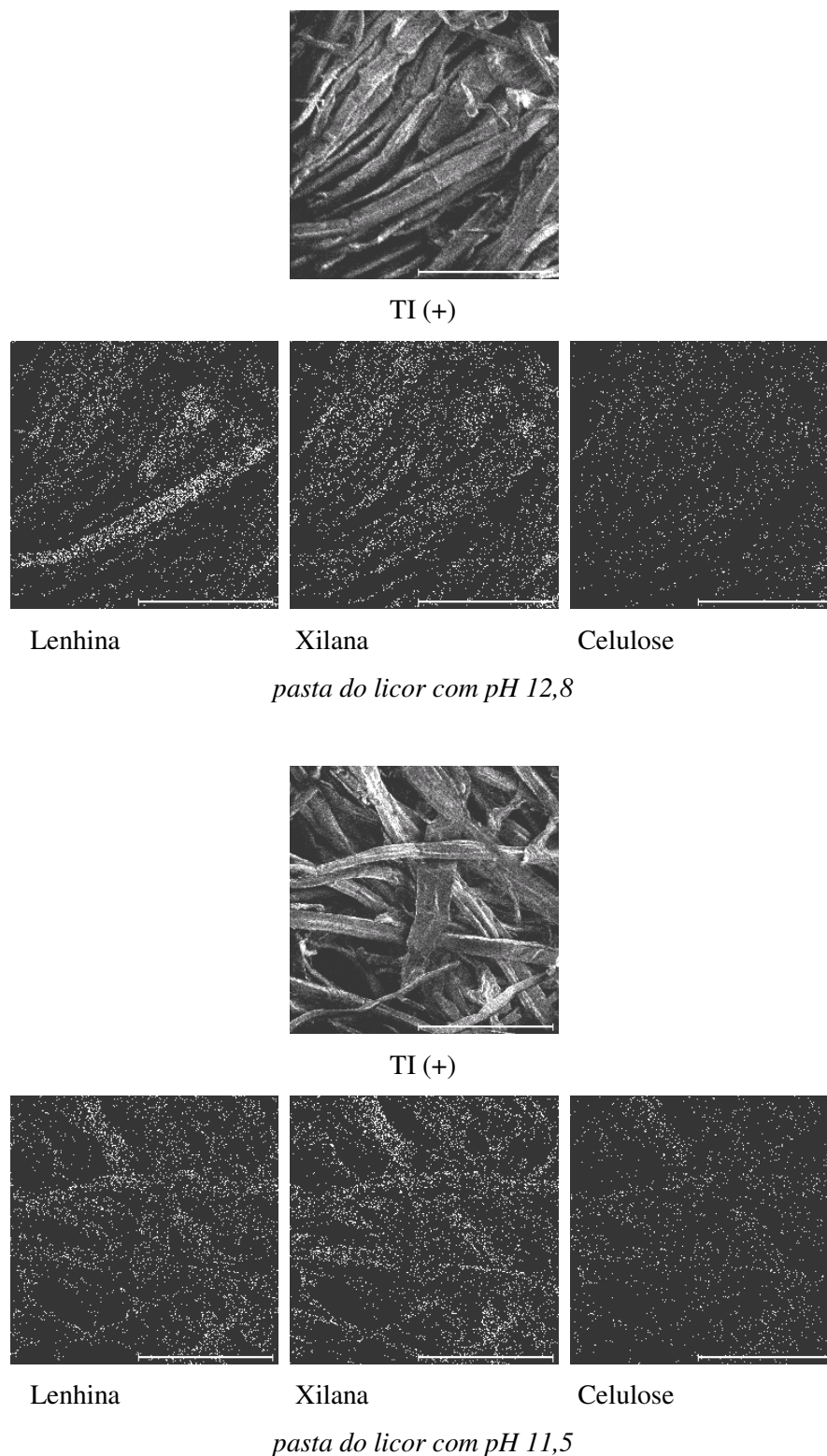


Figura 64 – Imagens de ToF-SIMS da superfície das pastas. Imagens em modo positivo dos íons totais (TI), lenhina (137, 151, 167, 181 Da), xilana (113, 115, 133 Da) e celulose (127, 145 Da).

Nas análises de ToF-SIMS, feitas às pastas não extraídas, observaram-se os picos característicos da celulose, da xilana, da lenhina, dos extractáveis e de alguns metais (Tabela 39). Não se verificaram diferenças nas intensidades dos picos dos diferentes compostos nas diferentes pastas analisadas.

Obtiveram-se algumas imagens das superfícies das fibras. As imagens específicas de cada componente são obtidas através da captação dos iões característicos desse mesmo componente. Das imagens obtidas na Figura 64 não se conseguiram visualizar diferenças relevantes na superfície da fibra da pasta de partida (pH = 12,8) para a pasta resultante do abaixamento do pH com maior retenção de xilanas (pH = 11,5). No entanto, verificou-se em ambas as pastas uma maior quantidade de xilanas e de lenhina na superfície das fibras do que de celulose. Embora não se esperasse observar diferenças significativas entre as pastas, pretendia-se encontrar um aumento ligeiro no teor da xilana à superfície.

Tabela 39 – Resultados retirados do espectro obtido por TOF-SIMS.

Composto	Pico	Ião
<i>Hidratos de carbono</i>		
Celulose	127+	$C_6H_7O_3^+$
	145+	$C_6H_9O_4^+$
Xilana	115+	$C_5H_7O_3^+$
	133+	$C_5H_9O_4^+$
Lenhina	137+	$C_8H_9O_2^+$
	151+	$C_8H_7O_3^+$
	167+	$C_9H_{11}O_3^+$
	181+	$C_9H_9O_4^+$
<i>Metais</i>		
Sódio	23+	Na^+
Alumínio	27+	Al^{3+}
<i>Extractáveis</i>		
<i>Esteróis</i>		
Sitosterol	415+	$C_{29}H_{51}O^+$
	397+	$C_{29}H_{49}^+$
Oxo-sitosterol	411+	$C_{29}H_{47}O^+$

Pelas técnicas de ToF-SIMS e ESCA, não foram observadas grandes diferenças entre as pastas. Estas técnicas revelaram não ser adequadas para a detecção da deposição das xilanas na superfície das pastas nas condições estudadas.

Os resultados obtidos não foram os esperados porque outros resultados evidenciavam haver um aumento de xilose na composição das pastas. Assim recorreu-se a outra técnica que permitisse analisar a superfície.

4.3.2.2.6 Peeling enzimático

Analisaram-se a superfície das várias pastas por hidrólise enzimática e posterior determinação dos vários monossacarídeos por HPLC.

Os resultados obtidos por *peeling* enzimático mostraram que houve efectivamente precipitação nas pastas onde esta foi provocada, havendo um aumento no teor de xilose na superfície e também no interior da fibra (Figura 65).

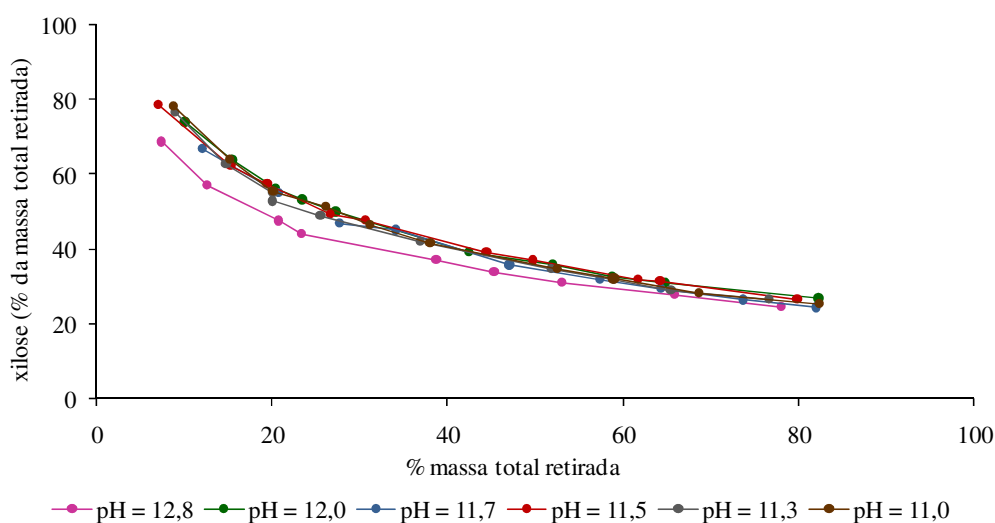


Figura 65 – Perfil da quantidade de xilanas retiradas por *peeling* enzimático.

No entanto, verificou-se que com o aumento da % total de massa retirada, a % de xilose retirada converge, significando que, nesta gama de pH, as xilanas precipitam maioritariamente na superfície.

Estes resultados mostraram que para vários valores de pH o grau de precipitação de xilanas na fibra foi idêntico (Figura 65). Verificou-se-se que a pasta inicial apresenta menor percentagem de xilose, para tempos de peeling mais curtos, que todas outras pastas, que descrevem o mesmo perfil de percentagem de xilose.

Estes resultados apontam que, além do pH, existem outros parâmetros a ter em conta na precipitação de xilanas. Nomeadamente questões físicas e difusionais, relacionadas com a estrutura e estado de intumescimento da fibra. A precipitação de lenhina na superfície da fibra pode também ser um factor importante na precipitação e difusão das xilanas nas fibras, visto poder dificultar estes processos.

4.3.2.2.7 Precipitação de xilanas em pasta kraft branqueada

Nas pastas onde se tentou precipitar as xilanas por abaixamento do pH, usou-se sempre o mesmo licor, logo a concentração das xilanas na solução era a mesma. Este facto pode explicar o grau de precipitação aproximadamente constante nos vários ensaios. De forma a clarificar estes resultados fez-se ensaios preliminares com pasta kraft branqueada em que a variável a estudar foi a concentração de xilanas na solução. Para tal, foram realizados dois ensaios onde se deixou a pasta kraft branqueada (18g) em contacto com aproximadamente 300 ml de solução de xilanas durante 2 horas e a 160°C, num reactor batch com agitação mecânica. Realizou-se também um ensaio onde não foram adicionadas xilanas (Tabela 40 e procedimento no capítulo 3.5.2).

Tabela 40 – Concentração de xilana na solução adicionada à pasta.

Amostra	Concentração de xilana na solução, g/L
Branco	0
Xil-I	6,4
Xil-II	12,6

Verificou-se que a influência da concentração de xilanas na solução é bastante significativa (Figura 66). Os ensaios efectuados resultaram num aumento máximo de quase 4% em xilose na pasta total (este valor foi determinado pelo valor obtido a ~65% de massa

total retirada que equivale aproximadamente à quantidade total existente na pasta (Figura 66). Outro facto importante que se verificou foi o aumento de xilose dentro da fibra, indiciando uma difusão e retenção da xilana no interior da fibra, contrariando o que se esperava ser apenas um fenómeno de precipitação na superfície. Caso a retenção de xilanas no interior da fibra não ocorresse, nas condições de precipitação utilizadas, a percentagem de xilose exibiria uma diminuição brusca para baixas % de massa total retirada e tenderia para valores idênticos para % de massa total retirada elevadas.

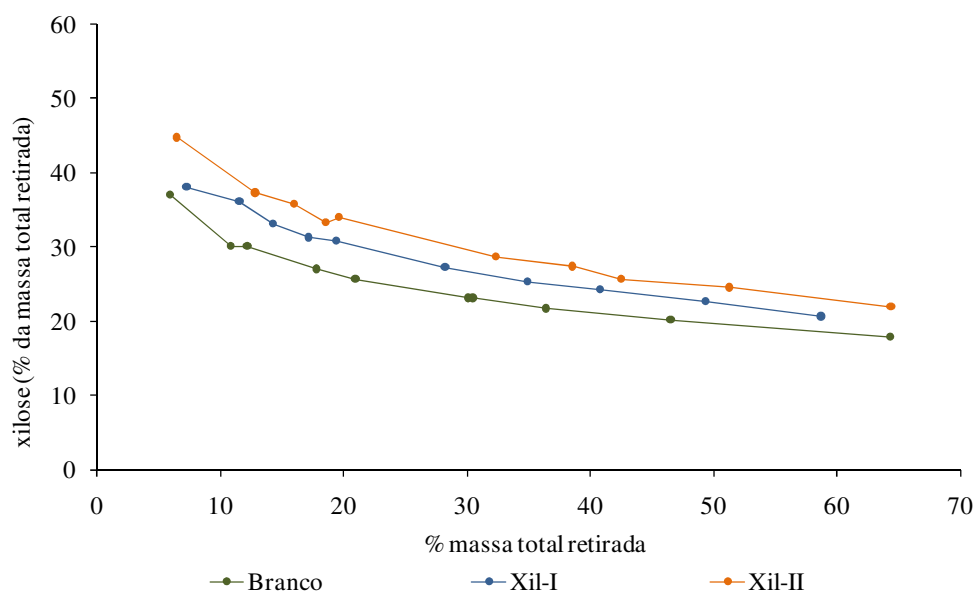


Figura 66 – Perfil da quantidade de xilanas retiradas por *peeling* enzimático.

As concentrações utilizadas nestes ensaios estão dentro da mesma gama que as concentrações determinadas para os licores negros dos cozimentos kraft. Este facto indicia que os fenómenos de precipitação e absorção de xilanas podem ocorrer no final do cozimento se existirem condições propícias. Assim, foi necessário perceber que condições favorecem a retenção de xilanas nas fibras, estudando para tal os parâmetros mais importantes do cozimento.

4.3.3 Precipitação de xilanas em fibras celulósicas

Nestes ensaios de precipitação foram estudados vários parâmetros de reacção: a concentração da solução de xilanas, o tempo de contacto entre as fibras e a solução de xilanas, o pH da solução e a fonte de celulose.

As reacções de precipitação foram realizadas em pequenas autoclaves de 50 ml, usando para isso 30 ml de solução de xilana para 1g de fibras celulósica de cotton linters (*Cotton linters*).

4.3.3.1 Variação da concentração de xilana

O primeiro parâmetro a ser estudado foi a concentração da solução de xilanas. Foram utilizadas concentrações de xilanas de 0,1g de xilana/30ml de solução (3,3g/L), de 0,2g de xilana/30ml de solução (6,7g/L) e de 0,5g de xilana/30 ml de solução (16,7g/L). As concentrações de xilana utilizadas estão na gama de concentrações obtidas para o licor negro (10-14,5g/L) (Tabela 8).

Depois de se dissolver as xilanas na solução aquosa de NaOH a pH 10 e a 90°C, o pH diminuiu para um valor por volta dos 5, como resultado das reacções de degradação parcial das xilanas, nomeadamente a hidrólise dos grupos MeGlcA e reacções de peeling e consequente conversão da xilose em ácido xiloisossacarínico. Foi necessário por isso reajustar o pH para um valor de 10. A fonte de celulose utilizada nestes ensaios foram as fibras de cotton linters – de cadeia longa (*Cotton linters*).

Depois de realizar os vários ensaios a tempos variados e a 115°C, foi efectuada a análise de açúcares às amostras finais.

A concentração da solução mostrou ser um factor bastante importante na retenção das xilanas na fibra (Figura 67). Verificou-se um aumento significativo no teor de xilose nas pastas, até um máximo de cerca de 3,5%, dependente do tempo e da concentração da solução de xilanas. Estes valores são comparáveis aos obtidos no ensaio de precipitação de xilanas em pasta kraft branqueada, embora as condições dos ensaios não sejam iguais.

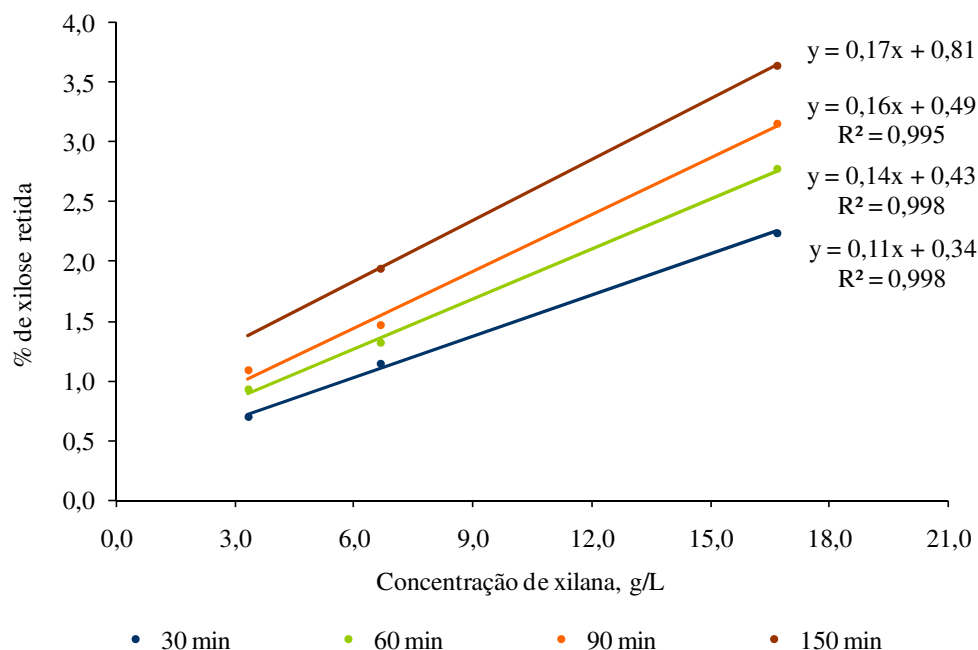


Figura 67 – Variação da percentagem de xilose nas amostras depois dos ensaios de retenção com a concentração de xilana na solução, para vários tempos de reacção.

Pode haver vários mecanismos envolvidos no processo de retenção de xilanas nas fibras. Os mecanismos passíveis de ocorrer à superfície da fibra são a precipitação e a adsorção. Se o mecanismo preponderante for a adsorção a % de xilose retida deveria aumentar com a concentração até se atingir um patamar (admitindo os cenários mais simples – isotérmicas de adsorção em monocamada de Langmuir ou Freundlich) (201). Verifica-se, pelos resultados descritos (Figura 67) que para a gama de concentrações usadas não se atinge o patamar de saturação. Assim, ou a saturação ocorre a valores de concentração superiores ou existe outro mecanismo que afecta a retenção de xilose nas fibras. Foi visto anteriormente que o enriquecimento das fibras não se dá simplesmente à superfície. Outro mecanismo que ocorre simultaneamente à precipitação ou à adsorção na superfície é a difusão de xilanas para o interior da fibra. A difusão de moléculas para o interior da fibra e consequente retenção é favorecida por maiores gradientes de concentração entre a solução exterior e o interior da fibra. Assim, concentrações de solução mais elevadas vão resultar em maiores teores de xilana difundida para o interior da fibra e maiores graus de absorção. Ocorrendo os mecanismos de adsorção e difusão para o interior da fibra, a quantidade de xilose retida será superior que a obtida só pelo mecanismo de adsorção. No caso de haver os dois mecanismos, o patamar de saturação surge a valores de

concentração mais elevados, visto ser necessário atingir os equilíbrios de adsorção e de concentrações entre o exterior e o interior da fibra.

4.3.3.2 Variação do tempo de contacto

Outro parâmetro importante é o tempo de contacto entre as fibras de *Cotton linters* e as xilanas. Foram realizados ensaios com tempos diferentes, para as várias concentrações escolhidas, mantendo o pH e a temperatura constantes.

Dos dados anteriores (Figura 67) pode-se ver que o tempo de contacto é também bastante importante. O aumento de tempo resulta em quantidades de xilana retida mais elevadas. Mais uma vez, os mecanismos envolvidos aqui serão a adsorção ou precipitação na superfície e a absorção no interior das fibras.

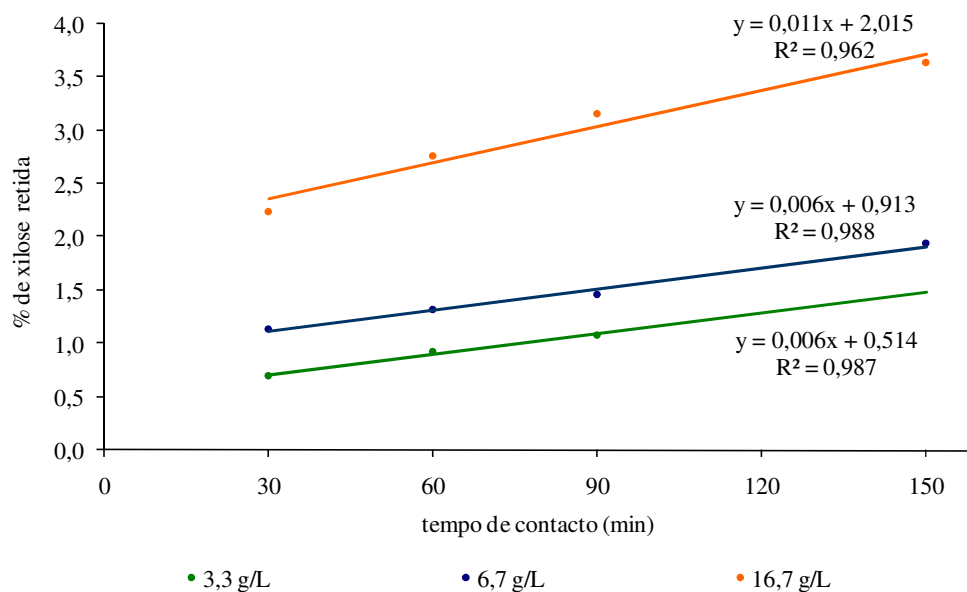


Figura 68 - Variação da percentagem de xilose nas amostras depois dos ensaios de retenção com o tempo de reacção, para as várias concentrações.

Até que se atinja o equilíbrio de adsorção na superfície das fibras e o equilíbrio de concentrações entre a solução e o interior da fibra, o tempo é favorável ao aumento da retenção das xilanas (201). Para os tempos de contacto estudados verificou-se que ainda não foram atingidos os equilíbrios mencionados, pois caso contrário e para uma dada

concentração, a percentagem de xilose retida não seria influenciada pelo tempo. No equilíbrio a quantidade de xilana retida, seria constante para os vários tempos utilizados.

4.3.3.3 Variação do pH da solução

O pH foi também um dos parâmetros estudados. Os resultados dos cozimentos estendidos e abaixamento do pH revelaram que este parâmetro tem alguma influência na retenção das xilanas nas fibras.

No estudo dos parâmetros anteriores surgiu a dúvida, se a retenção relatada seria realmente resultado da variação da concentração e do tempo de reacção ou do abaixamento do pH observado no fim da reacção (Tabela 41).

Foi visto anteriormente (capítulo anterior) que este abaixamento não justificaria as variações acentuadas na retenção das xilanas e, se fosse verdade que a retenção resultasse deste facto, então a esta atingiria apenas um valor, visto o pH final de todas as reacções ser muito semelhante. O pH final das soluções apresenta um ligeiro abaixamento com o aumento da concentração e do tempo de reacção.

Tabela 41 – pH das soluções finais, depois dos ensaios experimentais a pH =10.

	3,3g/L	6,6g/L	16,7g/L
30 min	7,5	7,6	7,2
60 min	7,4	7,0	6,9
90 min	7,2	6,8	6,7
150 min		6,5	6,4

Nas soluções usadas nos ensaios, as xilanas já se apresentam parcialmente degradadas, como resultado das reacções de hidrólise dos grupos MeGlcA e das reacções de peeling e conversão da xilose em ácido xiloisossacarínico.

Assim, decidiu-se aumentar o pH da solução inicial para pH 12, de forma a este abaixamento ser contrariado e o pH final não atingir valores tão baixos. Foram realizados ensaios em fibras de *Cotton linters* utilizando a concentração e os tempos que revelaram

maior retenção de xilanas (concentração 16,7g/L e tempos de 90 e 150 min). Os resultados mostraram que o aumento de pH fez aumentar a quantidade de xilana retida (Figura 69).

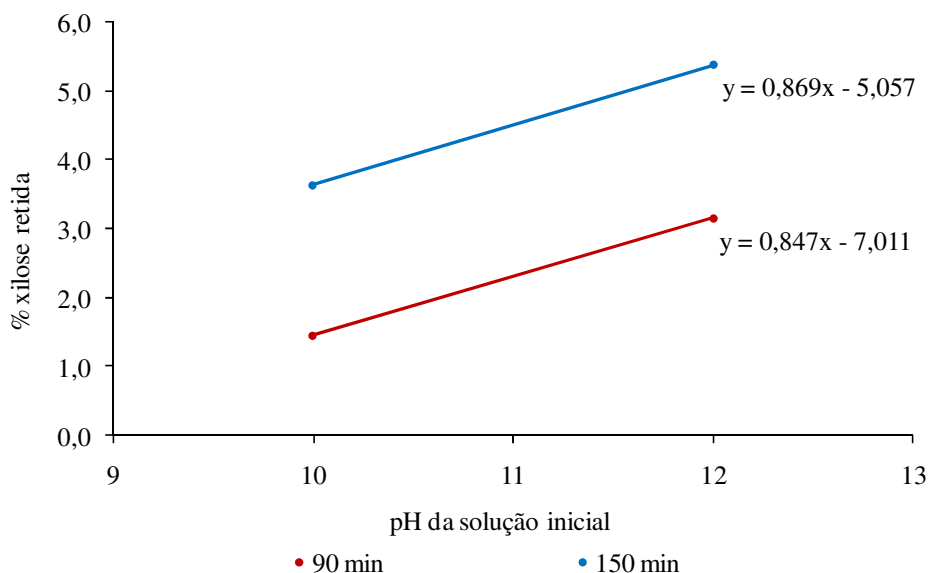


Figura 69 - Variação da percentagem de xilose nas amostras depois da reacção de precipitação com o tempo de reacção com diferentes valores de pH.

Estes resultados demonstraram claramente a influência do pH. A retenção aumentou em aproximadamente 2% em xilose com o aumento do valor de pH de 10 para 12. O aumento da quantidade de xilose nas fibras de *Cotton linters* resultou do facto do aumento do pH obrigar ao intumescimento das fibras e como consequência a uma maior facilidade na difusão das moléculas de xilana para o interior desta, aumentando naturalmente a sua composição em xilose. Note-se que neste processo pode haver competição de dois mecanismos. A adsorção e a precipitação que são favorecidos pelo abaixamento do pH e a difusão de xilanas no interior da fibra, que é favorecida pelo intumescimento da fibra resultante do aumento do pH. Claramente o mecanismo de difusão está favorecido face aos mecanismos de adsorção e precipitação.

O valor final do pH nas soluções finais apresentou, como tinha acontecido nas experiências anteriores, um abaixamento de valores de pH de 12 para valores compreendidos entre 9 e 10. O abaixamento do pH no final dos ensaios demonstra que os processos de degradação das xilanas e da celulose continuam ao longo de todo o ensaio, ocorrendo em simultâneo com os processos de adsorção e absorção das xilanas.

É importante mencionar que no teste de referência, realizados em condições idênticas às anteriores, o abaixamento do pH também foi detectado. Nestes ensaios as autoclaves continham apenas a solução alcalina e as fibras de *Cotton linters* ou a solução de xilana. Visto as soluções de xilana não apresentarem abaixamentos de pH significativos, a diminuição de pH no final do ensaio resulta essencialmente das reacções de degradação da celulose, nomeadamente das reacções de peeling e da conversão da glucose no ácido glucoisossacarínico.

Assim do conjunto de resultados obtidos conclui-se que maiores valores de pH, maiores tempos de contacto entre as fibras e a solução e maiores concentrações de xilana resultam em maiores graus de retenção de xilanas, concordando com o que vem descrito na literatura para outras árvores (25, 101, 131). Verificou-se ainda que existem vários mecanismos a contribuir para esta retenção.

É importante realçar que alguns destes resultados dificilmente poderão ser extrapolados para o sistema industrial. O estudo dos parâmetros determinantes na precipitação e retenção das xilanas é bastante complexa e envolve muitas outras condicionantes, nomeadamente a força iónica e a concentração de lenhina na solução e na pasta, que não foram tidas em conta nestes ensaios. Os resultados obtidos nos sistemas modelo utilizados aqui deverão ser interpretados com algum cuidado.

4.3.3.4 Variação da fonte de celulose

Uma vez que se observou um aumento significativo de xilose nas fibras *Cotton linters*, pensou-se em estudar o efeito da fonte de celulose, isto é, até que ponto a celulose utilizada, sendo bastante pura e sem xilose na sua composição, influencia a extensão da precipitação das xilanas. Assim, foram realizados ensaios comparativos com fibras de *Cotton linters*, de algodão comercial (*AlgC*), de pasta kraft de eucalipto branqueada (*Pbranq*) e de pasta kraft de eucalipto branqueada extraída (*PbranqEx*). As fibras do *AlgC* e das pastas kraft (*Pbranq* e *PbranqEx*) apresentaram um elevado intumescimento quando estas foram colocadas em contacto com a solução de xilana, o que impossibilitou a agitação das fibras no interior das autoclaves. De forma a garantir a agitação no interior da

autoclave, em vez de se usar 1g de amostra como nos ensaios anteriores, só foi possível utilizar cerca de 100 mg.

4.3.3.4.1 Caracterização das fibras

Para compreender os diferentes graus de retenção nas diferentes fontes de celulose, foi necessário caracteriza-las quimicamente (através da sua composição em monossacarídeos) e morfológicamente (tamanho, integridade, aspecto da fibras e cristalinidade).

Tabela 42 – Composição em monossacarídeos das várias fontes de celulose usadas nas reacções de precipitação, % normalizada.

	Xilose	Manose	Galactose	Glucose
Cotton linters	0,2	0,1	0,0	99,7
AlgC	0,2	0,1	0,1	99,6
Pbranq	14,5	0,6	0,5	84,4
PbranqEx	4,5	0,5	0,2	94,8

A composição em monossacarídeos mostrou que as amostras *Cotton linters* e *AlgC* são extremamente puras, apresentando valores de glucose de ~100% (Tabela 42). A extracção da *Pbranq* conseguiu retirar uma grande percentagem de xilanas. Na extracção da *Pbranq* a quantidade de xilanas na pasta diminuiu cerca de 10%.

A morfologia e estado geral das fibras podem também influenciar a precipitação. Foi realizada análise microscópica às fibras.

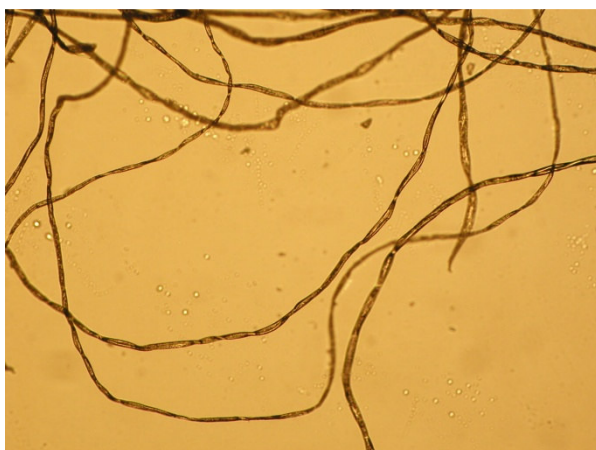


Cotton linters – 20x

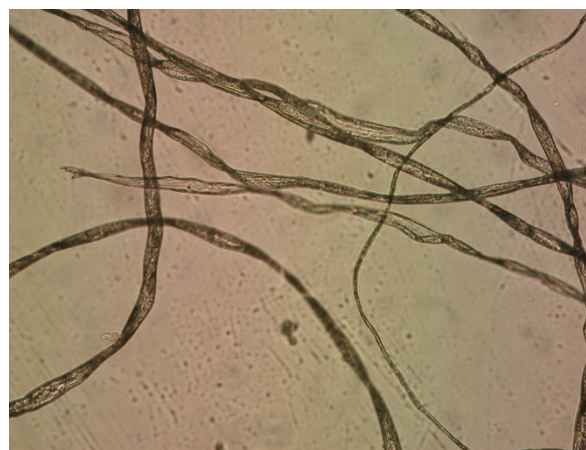


Cotton linters – 50x

Figura 70 – Imagem microscópica das fibras de Cotton linters.

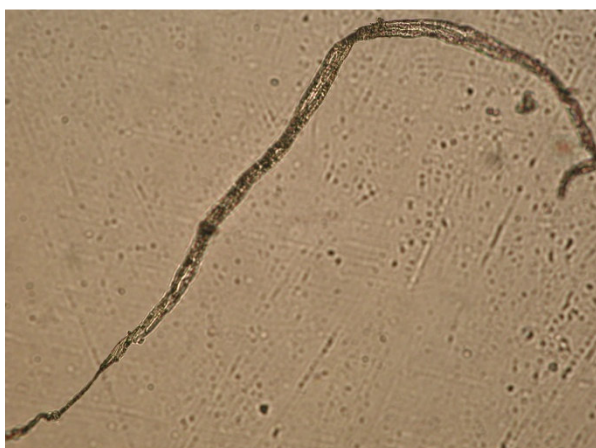


Algodão – 20x



Algodão – 50x

Figura 71 – Imagem microscópica das fibras de AlgC.



Pasta branqueada extraída – 20x



Pasta branqueada extraída – 50x

Figura 72 – Imagem microscópica das fibras de PbranqEx.

Das figuras anteriores pode-se ver que as várias fibras utilizadas apresentaram morfologias diferentes (Figura 70-Figura 72). Verificou-se que as fibras de *Cotton linters* estão bastante partidas e que as extremidades estão quebradas (Figura 70). As fibras da *Pbranq* são bastante mais longas que as fibras de *Cotton linters*, embora sejam mais curtas que as do *AlgC*. As fibras da *Pbranq* e do *AlgC* apresentam as extremidades das fibras intactas (Figura 71 e Figura 72).

As diferenças observadas podem influenciar claramente a retenção de xilanas nas fibras. As fibras de *Cotton linters*, além de uma maior área superficial específica disponível para a adsorção das xilanas na superfície e para a difusão e absorção das xilanas para o seu interior, apresentam ainda as extremidades quebradas (Figura 70). As extremidades quebradas representam cortes transversais às fibras. Os cortes na fibra nesta direcção facilitam a difusão em grande escala de moléculas para o seu interior, no sentido do eixo da fibra. Em meio alcalino as fibras de *Cotton linters* intumescem muito facilmente, permitindo a difusão rápida das xilanas para o seu interior. As outras fibras, *AlgC* e *PbranqEx*, apresentam as extremidades intactas e uma menor área superficial específica disponível para a adsorção e difusão (Figura 71 e Figura 72). Nestas amostras a difusão no sentido do eixo da fibra dá-se em pequena escala, ocorrendo a difusão de moléculas para o interior da fibra essencialmente no sentido perpendicular ao eixo da fibra.

Foram determinados também os graus de cristalinidade das várias fibras celulósicas utilizadas.

Tabela 43 - Grau de cristalinidade das fibras celulósicas usadas.

	Grau de cristalinidade, %
Cotton linters	86,8
AlgC	80,7
Pbranq	75,4
PbranqEx	71,7

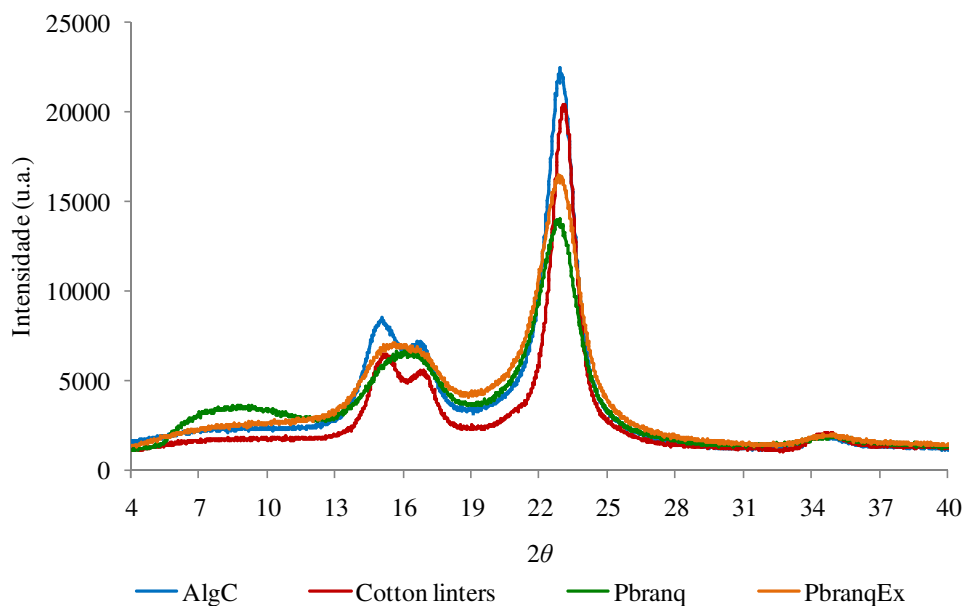


Figura 73 - Difractogramas de raios-X das diferentes amostras.

Verificou-se que a cristalinidade das amostras *Cotton linters* e *AlgC* são bastante elevadas. A cristalinidade das fibras de *PbranqEx* é coerente com valores típicos para as pastas kraft de *Eucalyptus globulus*. A cristalinidade determinada para as fibras de *Pbranq* é elevada comparativamente às fibras de *PbranqEx* e aos valores típicos para este tipo de pasta (178, 202).

4.3.3.4.2 Retenção das xilanas nas várias fontes de cellulose

Os ensaios efectuados aos vários tipos de fibras celulósicas vieram confirmar a importância da morfologia das fibras no processo de retenção de xilanas.

Observou-se um aumento do teor de xilana em todas as fontes de cellulose, no entanto a retenção mais extensa ocorreu nas fibras de *Cotton linters* e a menos extensa nas fibras de *AlgC* (Figura 74).

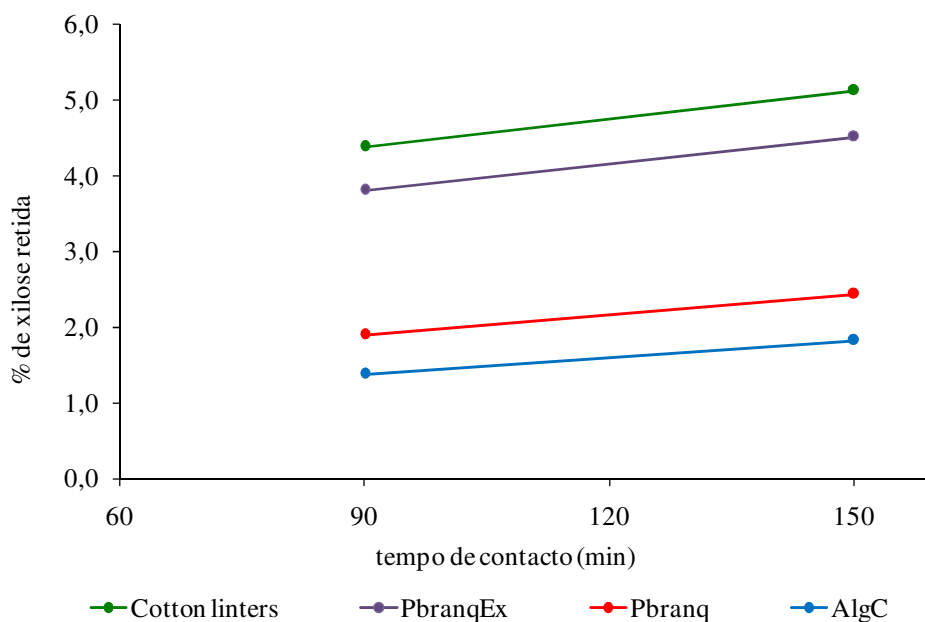


Figura 74 - Variação da fonte de celulose para dois tempos de reacção, pH =12 e concentração da solução de 16,7g/L.

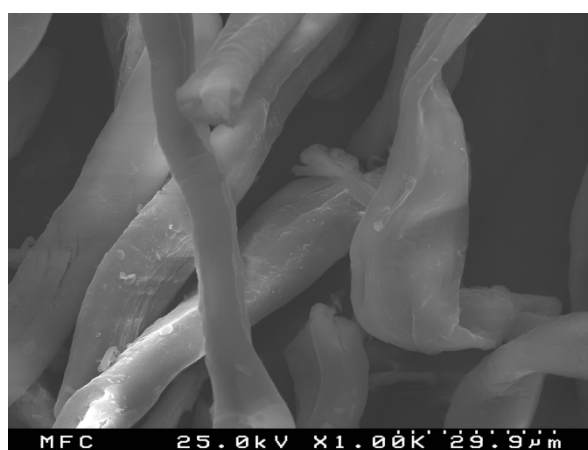
Verificou-se que o baixo teor de xilanas na composição das fibras de *AlgC* não influencia o grau de retenção destas, uma vez que esta amostra apresenta o menor grau de retenção de xilanas e um dos menores teores de xilose. A diferença mais marcante entre as fibras e que resulta em maiores desigualdades nos teores de retenção de xilanas é claramente a morfologia e a cristalinidade das amostras. As fibras de *AlgC* apresentam-se, como se viu, com extremidades intactas e uma menor área superficial específica disponível para a adsorção e difusão. Além disso, as fibras de *AlgC* apresentam ainda um grau de cristalinidade muito elevado. Todos estes factores dificultam a adsorção na superfície das fibras e a difusão de xilanas para o seu interior. A estrutura cristalina das fibras de *AlgC* não permite o mesmo grau de intumescimento que uma estrutura amorfa, uma vez que a penetração da solução alcalina nas fibras celulósicas se dá principalmente através das regiões amorfas. Assim fibras mais cristalinas permitem uma menor penetração da solução de xilanas e consequentemente uma menor difusão destas para o interior das fibras.

No entanto, pode-se observar que as fibras de *Cotton linters* apresentam o maior grau de retenção de xilanas mesmo exibindo o grau de cristalinidade mais elevado. Neste caso, a alta cristalinidade é contrabalançada pelo estado geral das fibras, partidas e com extremidades quebradas, que facilitam a difusão de xilanas para o interior das fibras.

É importante notar a diferença entre a *Pbranq* e a *PbranqEx*. A retenção de xilanas na *PbranqEx* é significativamente superior. A *Pbranq* contém um teor de xilose inicial bastante superior ao da *PbranqEx* (Tabela 42). As xilanas iniciais da *Pbranq* podem estar a dificultar a adsorção na superfície e a difusão das xilanas para o interior da fibra. A quantidade de xilanas na superfície das fibras cria um impedimento à adsorção de outras xilanas, não permitindo uma retenção de xilanas mais extensa. Além disso, a velocidade de difusão das xilanas para o interior da fibra depende do gradiente de concentrações de xilanas entre a solução exterior e o interior da fibra. Havendo uma concentração de xilanas superior nas fibras da *Pbranq*, a migração de xilanas da solução para o interior da fibra não se dá tão rapidamente, havendo uma diminuição na retenção de xilanas.

4.3.3.5 Análise à superfície das fibras

Para entender o mecanismo que está por detrás do aumento do teor xilose nas fibras depois dos ensaios de retenção de xilanas, fez-se análise por SEM (Scanning electron microscope) às amostras. Pretendia-se encontrar indícios dos fenómenos de precipitação e/ou de adsorção através do aparecimento de material na superfície das fibras. Assim, foram analisadas por esta técnica as fibras de Cotton linters, visto estas terem apresentado maiores teores de xilana retida.



A

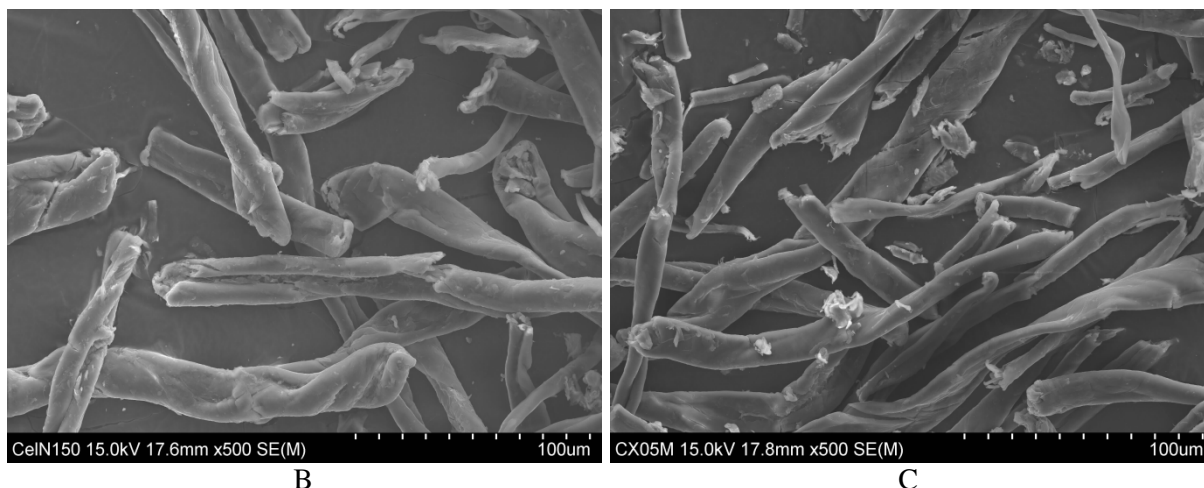


Figura 75 – Imagens de SEM das fibras de Cotton linters. A – Cotton linters de partida, B – Cotton linters resultante do ensaio alcalino sem xilanas a pH=10 e 150 min, C – Cotton linters depois do ensaio de retenção de xilanas com concentração de 16,7g /L, 150 min de reacção e pH= 10.

Pela Figura 75 e por comparação das imagens A e B verificou-se que durante os ensaios de retenção das xilanas ocorre uma destruição ligeira das fibras, resultante apenas da alcalinidade e possivelmente da agitação no interior da autoclave.

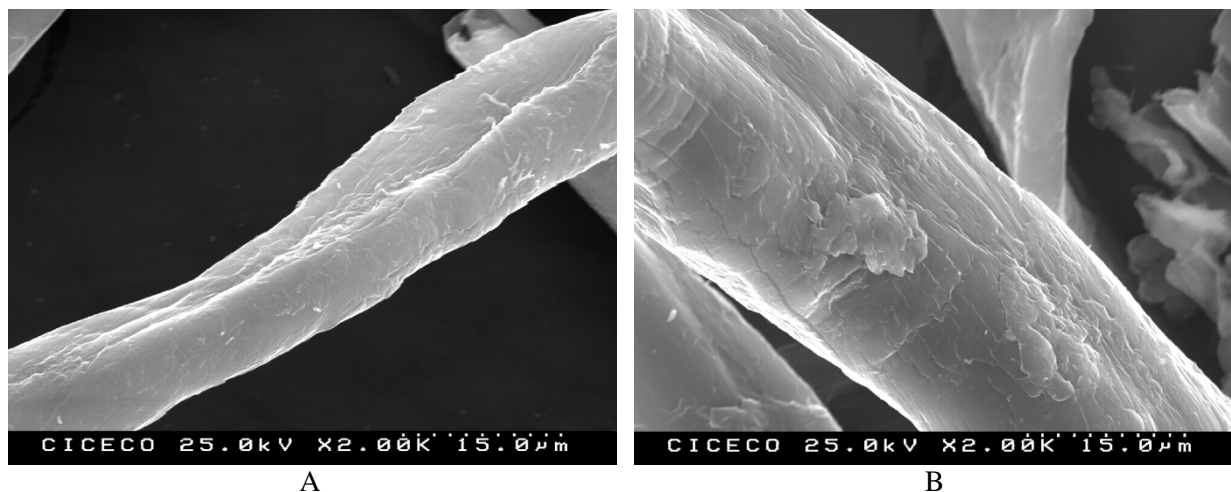


Figura 76 – Imagens de SEM das fibras de Cotton linters. A – Cotton linters resultante do ensaio alcalino sem xilanas a pH=12 e 150 min B – Cotton linters depois do ensaio de retenção de xilanas com concentração de 16,7g /L, 150 min de reacção e pH= 12

Quando se promoveu a precipitação na superfície das fibras não se conseguiu observar diferenças significativas entre as fibras (por comparação das imagens B e C), aparecendo pequenos pedaços de material que devem resultar da destruição das fibras. A Figura 76, mostrou claramente que a superfície das fibras com e sem precipitação são idênticas e bastante irregulares.

Nas condições experimentais utilizadas não foram detectado indícios de haver precipitação e/ou adsorção na superfície das fibras, nomeadamente o aparecimento de agregados, como ocorreu noutros trabalhos publicados (25, 67, 130, 133-135). A não formação de agregados resultou das baixas concentrações de xilanas utilizadas.

4.3.3.6 Peeling enzimático

Para analisar até que ponto há um enriquecimento de xilanas no interior das fibras por difusão e absorção, fez-se uma análise aos monossacarídeos pela técnica de *peeling* enzimático das amostras: pasta branqueada (*Pbranq*), pasta branqueada extraída (*PbranqEx*) e pasta branqueada extraída enriquecida com xilanas (duas amostras - *PbranqXil-I* e *PbranqXil-II*).

Com a extracção conseguiu-se reduzir o teor de xilanas de 14,5% para 4,5% (Tabela 42) e o enriquecimento da pasta extraída aumentou o teor de xilanas em aproximadamente 4% (Figura 74). A extracção das xilanas reduziu bastante o teor de xilose total e a diferença encontrada entre a superfície e o interior da fibra na pasta branqueada extraída (Figura 77).

Os resultados obtidos para as várias pastas revelaram que o enriquecimento das fibras não se deveu apenas a uma deposição na superfície, mas também a uma retenção das xilanas nas primeiras camadas internas da fibra. Os resultados da análise por *peeling* enzimático obtidos para a pasta branqueada estão de acordo com a literatura (128).

O enriquecimento das fibras com xilanas ocorreu em grande extensão na superfície, mas ocorreu também no interior das fibras, comprovado pelo valor obtido para tempos de *peeling* mais elevados e pela diminuição gradual da percentagem de xilose. Verificou-se que o comportamento da diminuição do teor de xilose da pasta enriquecida acompanha o comportamento da pasta inicial. Uma precipitação que tivesse ocorrido apenas na

superfície resultaria numa diminuição na percentagem de xilose, para tempos de peeling curtos, bastante mais abrupta do que a observada (Figura 77).

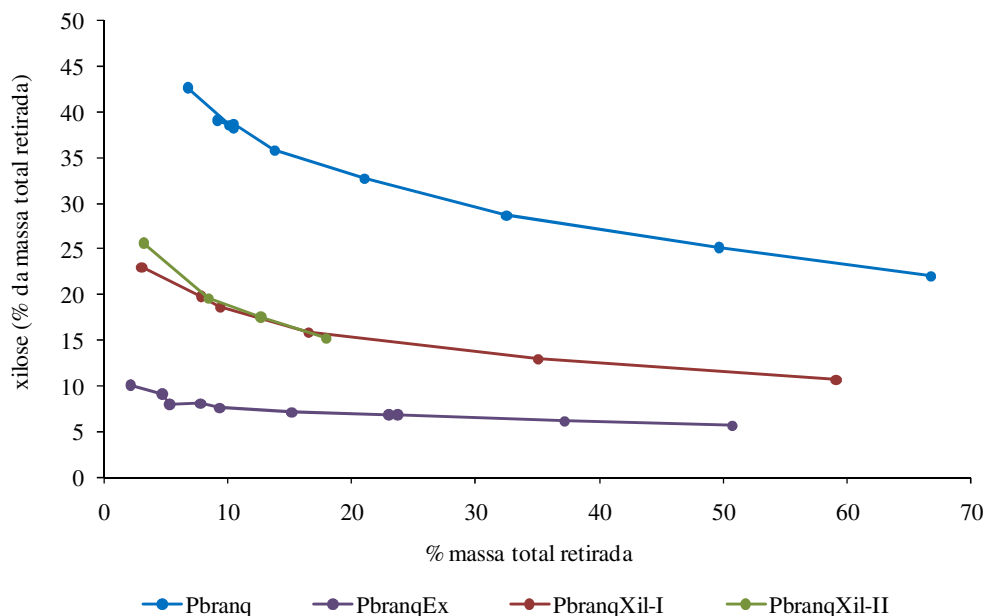


Figura 77 – Resultados do *peeling* enzimático. Ensaios de enriquecimento a pH=12, tempo de 150 min e concentração de 16,7g/L.

Estes resultados mostraram que aparentemente a perda de xilanas ao longo do cozimento é um processo reversível, sendo possível voltar a enriquecer as pastas com as xilanas previamente removidas. Em condições industriais, o abaixamento da alcalinidade provoca a diminuição do intumescimento da fibra o que impossibilita a visualização deste efeito de uma forma tão clara.

Fazendo a representação da variação do teor de xilana para cada tempo ($X_t - X_{t-1}$) por tempo de *peeling* decorrido ($t - t_0$), onde o X é a % de xilose na amostra e t o tempo de *peeling*, é possível ver até que ponto a extracção de xilanas da pasta é reversível (Figura 78).

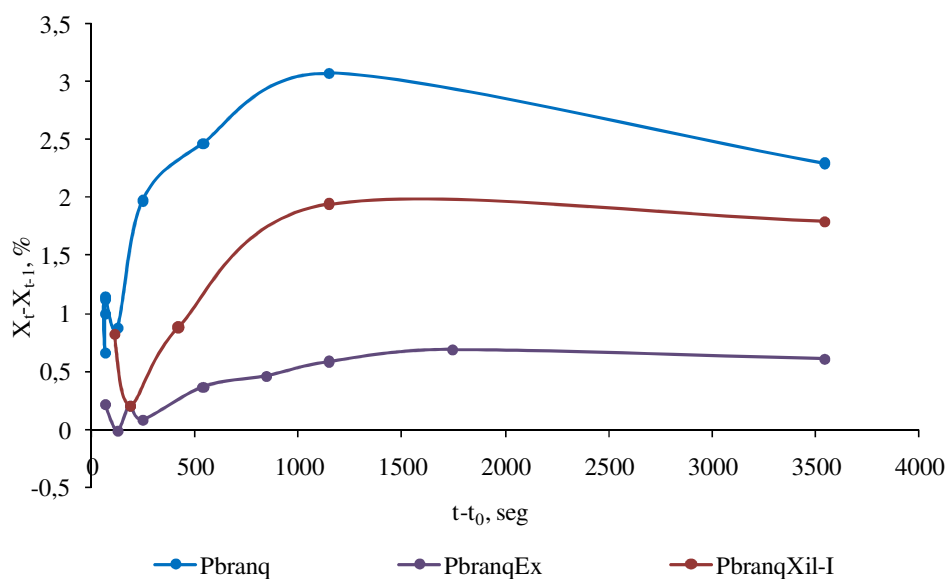


Figura 78 – Variação da diferença do teor de xilose na pasta por tempo de *peeling* decorrido ($t-t_0$).

Constatou-se que depois da perda das xilanas da pasta, as xilanas podem voltar a ser retidas (Figura 78). Verificou-se que a retenção não ocorre apenas na superfície das fibras mas também no interior destas. Observou-se um aumento significativo de xilose na superfície, demonstrado pelo grande declive observado no início do *peeling* enzimático. Depois de uma variação menos acentuada, verificou-se um novo aumento de xilose mais no interior da fibra (Figura 78). Se ocorresse apenas fenómenos de precipitação e ou adsorção na superfície da fibra, as variações do teor de xilanas ($X_t - X_{t-1}$), para $t-t_0$ mais elevados, seriam próximas ou iguais a zero, ou até mesmo negativas, o que não acontece. Na realidade, a amostra *PbranqXil-I* apresenta o mesmo perfil de distribuição das xilanas ao longo da fibra que a amostra inicial (*Pbranq*), revelando que ensaios com gradientes de concentrações e tempos de contacto superiores resultaria na recuperação das xilanas extraídas.

4.3.3.7 Variação da xilana

Foram realizados também ensaios com xilanas recuperadas do licor negro. Estes ensaios pretendiam verificar se a xilana recuperada do licor negro e perdida da pasta para o

licor de cozimento poderia voltar a ser retida na pasta. A xilana dissolvida no licor está mais degradada, tem menor peso molecular médio e já sofreu algumas alterações estruturais, ao contrário da xilana comercial usada, que foi obtida directamente da madeira e por isso, estruturalmente, está mais intacta.

A experiência foi realizada a pH 12, visto ter sido este o pH óptimo estudado, com uma concentração de xilana aproximada de 0,14g de xilana/30 ml (4,7g/L) de solução e com fibras de *Cotton linters*.

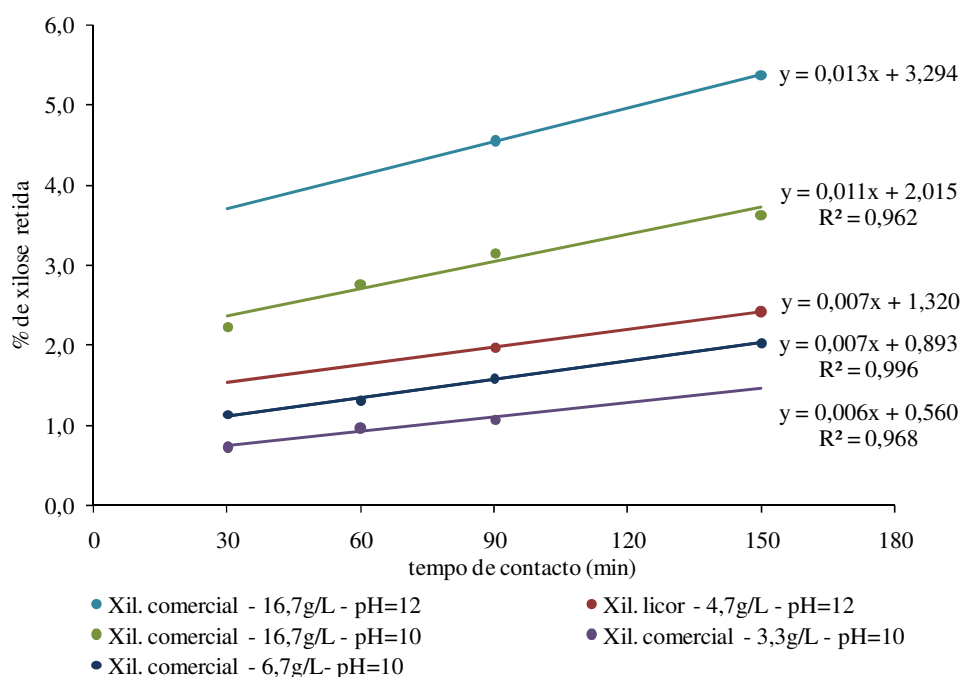


Figura 79 – Comportamento da xilana do licor negro em comparação com a xilana comercial.

A xilana do licor apresentou um grau de retenção análogo ao da xilana comercial usada nos outros ensaios. Embora as condições experimentais não sejam igual a nenhum dos outros ensaios, o aumento do teor de xilose observado para esta xilana está dentro do que era esperado. Verificou-se um valor de retenção de xilanas superior aos ensaios onde se usaram soluções com pH inferior, um teor de xilose retida inferior aos ensaios onde se empregou as concentrações de 16,7g/L (Figura 79). É necessário salientar que o peso molecular e o grau de substituição da xilana podem também condicionar a retenção da xilana.

Os resultados demonstraram que, mais uma vez, existem vários factores a considerar na retenção das xilanas. O uso de concentrações mais elevadas resulta em gradientes de concentração superiores entre a solução e as fibras, promovendo uma difusão mais rápida do exterior para o interior das fibras. Por outro lado observa-se o efeito do pH que favorece o intumescimento a valores elevados, facilitando o mecanismo de difusão e posterior absorção, e favorece a precipitação e a adsorção à superfície a valores mais baixos.

4.3.4 Conclusões

Os resultados obtidos nos cozimentos kraft com variação das condições processuais (tempo de cozimento e alcalinidade) não permitiram concluir se ocorre a precipitação das xilanas no final do cozimento. A variação da quantidade de xilose e de glucose nas pastas foi muito pequena e resultou essencialmente da diferença de alcalinidade. O tempo de cozimento não mostrou ter grande efeito na composição das pastas.

Os ensaios de precipitação de xilanas na pasta, feitos por prolongamento do cozimento e simultâneo abaixamento do pH do licor negro, permitiram confirmar a precipitação em pequena escala de xilanas no final do cozimento. A adição do ácido levou naturalmente ao abaixamento do pH de 12,8 para valores entre 12 e 10 e observou-se um aumento gradual e pouco significativo do rendimento em massa até um máximo de 2,3%. Verificou-se, além da precipitação de xilanas, a precipitação simultânea de lenhina, mais acentuada para valores de pH <11,3. No entanto, não se verificou uma variação significativa na composição das xilanas extraídas das pastas. Foi observado apenas um aumento no teor de glucose das xilanas em relação à xilana da pasta de partida, resultado da precipitação das xilanas do licor que são mais ricas em glucose que as xilanas da pasta. A composição em monossacarídeos das pastas e a análise dos grupos carboxilos apresentaram resultados mais conclusivos, verificando-se um aumento de aproximadamente 1,2% no teor de xilose e um aumento da concentração de grupos carboxilos da pasta de partida para as pastas onde foi induzida a precipitação por abaixamento de pH. O peeling enzimático confirmou que houve efectivamente deposição de xilanas nas pastas, havendo um aumento no teor de xilose na superfície e também no interior da fibra, mas esta deposição não mostrou grande dependência do pH do licor.

Conclui-se que o abaixamento do pH, na gama de pH estudado (10-13), não será o parâmetro principal na precipitação das xilanas nas fibras, uma vez que independentemente do pH final a extensão de deposição de xilanas na fibra é aproximadamente a mesma.

Dos primeiros ensaios de precipitação, com soluções de diferentes concentrações de solução de xilanas do licor negro em contacto com pasta kraft branqueada, viu-se que a concentração de xilanas na solução tem uma influência bastante significativa na precipitação e que o aumento do teor de xilose ocorre na superfície e no interior das fibras.

Os ensaios de precipitação de xilanas comerciais em fibras celulósicas derivadas de algodão e de pasta kraft branqueada vieram confirmar que a concentração de xilanas na solução é um parâmetro bastante importante. Verificou-se que a retenção das xilanas nas fibras ocorre por vários processos, nomeadamente por precipitação e adsorção na superfície e absorção no interior das fibras. Uma maior concentração de xilana na solução resulta em maiores graus de precipitação e/ou adsorção na superfície da fibra e também em maiores gradientes de concentração entre a solução e o interior da fibra, que favorecem a difusão de xilanas para o interior da fibra e a sua absorção.

O tempo que as xilanas da solução e as fibras celulósicas ficam em contacto é também um parâmetro muito importante, pois maiores tempos de interacção permitem que se atinjam os equilíbrios de adsorção e absorção entre a solução e a fibra, resultando em adsorções e absorções mais extensas.

Em relação ao pH, os resultados foram aparentemente inesperados. O aumento do pH fez aumentar o grau de deposição de xilanas nas fibras de celulose, resultado do maior intumescimento que o aumento da alcalinidade provoca e da maior facilidade de difusão das moléculas de xilana para o interior das fibras. Assim, maiores valores de pH, maiores tempos de contacto e maiores concentrações de xilana resultam em graus de adsorção/absorção superiores.

A morfologia e a estrutura das fibras são factores igualmente importantes na deposição das xilanas. O maior aumento do teor de xilanas foi observado nas fibras de *Cotton linters*, que embora tenham apresentado o maior grau de cristalinidade, apresentaram-se mais curtas e com extremidades quebradas. A maior área superficial específica que facilita a difusão das xilanas para o seu interior contrabalançou a cristalinidade. O menor aumento foi observado nas fibras de Algodão comercial, que se apresentaram mais longas e com extremidades intactas e de cristalinidade elevada. A

morfologia das fibras de Algodão comercial dificultou a retenção de xilanas na superfície e no interior das fibras. Verificou-se ainda, por comparação dos resultados obtidos entre as fibras de Pasta branqueada e Pasta branqueada extraída, que o teor de xilanas na fibra pode influenciar a retenção destas diminuindo a adsorção e absorção de xilanas nas fibras.

Durante o contacto entre as fibras de celulose e a solução de xilanas há um enriquecimento de xilanas nas primeiras camadas internas das fibras por absorção, além da deposição na superfície da fibra. Por peeling enzimático verificou-se que a adsorção/absorção das xilanas é um processo reversível. O gradiente de concentrações existente entre a solução de xilana e as fibras e o tempo de ensaio são factores importantes nesta migração de xilanas da solução para a fibra.

A xilana precipitada do licor negro, embora menos íntegra e de menor peso molecular, apresenta a mesma aptidão para precipitar nas fibras de celulose e um comportamento análogo à xilana comercial usada. As xilanas do licor negro podem assim ser utilizadas no enriquecimento das pastas kraft correspondentes.

Os ensaios de precipitação permitiram concluir que a extensão do cozimento e o enriquecimento do licor negro em xilanas na fase final do cozimento, mantendo as fibras intumescidas através do controlo do pH, podem provocar efectivamente um aumento do teor de xilanas nas pastas. Industrialmente, estes resultados são promissores, podendo melhorar o rendimento final em pasta do cozimento kraft através do aumento do teor de xilanas e de glucanas. No entanto os resultados têm que ser interpretados com algum cuidado, já que um maior intumescimento facilita também a migração e retenção na fibra da lenhina e dos seus produtos do cozimento no interior da parede celular, dificultando também o processo de lavagem.

5. CONCLUSÕES FINAIS

Este trabalho constitui um contributo para o conhecimento da química e estrutura das xilanas e glucanas do *E. globulus*, os seus comportamentos durante o cozimento kraft e a sua precipitação sobre a pasta.

Durante o cozimento kraft, a dissolução de polissacarídeos atinge o seu máximo (18% do peso inicial da madeira) no início de fase principal do cozimento; a partir desta fase a dissolução de polissacarídeos é pouco significativa. Cerca de metade das xilanas (40-50%) removidas da madeira na fase principal e residual do cozimento são substâncias poliméricas, parcialmente degradadas, que podem ser precipitadas por acidificação do licor negro.

A análise estrutural das xilanas isoladas do licor e da pasta mostrou claramente diferenças entre elas. As xilanas dissolvidas no licor possuem uma maior associação às glucanas e às galactanas que as xilanas da pasta. As glucanas e galactanas, que compõem as ramificações das xilanas e que estão presentes principalmente no licor negro, apresentam também uma relativa estabilidade às condições alcalinas usadas durante o cozimento. As alterações estruturais das xilanas e a dissolução das xilanas mais ricas em glucose e galactose ocorrem essencialmente no início da fase principal. As xilanas poliméricas do licor têm pesos moleculares em média 30% inferiores (cerca de 18-19 kDa) aos das xilanas da madeira. Pelo contrário, as xilanas extraídas das pastas apresentam estrutura e pesos moleculares médios (25-27 kDa) semelhantes aos das xilanas da madeira. As alterações estruturais das xilanas ocorrem parcialmente nas cadeias laterais, através da degradação do MeGlcA e formação do HexA ao longo do cozimento. Embora a degradação dos ácidos urónicos ocorra em todas as xilanas envolvidas no cozimento, as xilanas das pastas são menos afectadas, preservando parcialmente os seus grupos urónicos até ao fim do cozimento.

O aumento da alcalinidade do licor de cozimento afecta a composição das xilanas da pasta e do licor, fazendo diminuir o teor de glucose e galactose como resultado da maior extensão das reacções de degradação das glucanas e das galactanas associadas estruturalmente às xilanas.

A análise de licores de cozimento mostrou que, depois da xilana, as glucanas são o segundo grupo de hemiceluloses mais abundante dissolvido da madeira. O teor das glucanas e glucomananas na madeira estudada atingiu quase 7%, tendo-se estimado cerca de 2,5% de glucomananas e 4-4,5% de α - e β -glucanas na madeira de *E. globulus*. A α -

glucana é a glucana mais abundante (>4%) e é constituída por 83% de amilopectina e 17% de amilose. A caracterização das glucanas da madeira permitiu verificar que o MeGlcA está envolvido na ligação que se estabelece entre as xilanas e as glucanas, tendo sido identificado o fragmento α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)-D-Glcp-(1 \rightarrow 2)-4-O-Me-GlcAp-(1 \rightarrow 2)-D-Xylp. A ligação Xil-MeGlcA-Glc é relativamente forte e estável, justificando as quantidades elevadas de glucanas nas xilanas isoladas do licor. A ligação que se estabelece entre as glucanas e xilanas foi comprovada pela primeira vez e explica a precipitação conjunta de xilanas e glucanas.

As glucanas sofrem alguma degradação durante o cozimento, uma vez que o peso molecular médio das glucanas da pasta (7,3 kDa) é 13% inferior ao das glucanas da madeira (8,4 kDa). Esta diminuição, não muito acentuada nos valores do peso molecular médio, confirma a resistência relativa que estas têm à degradação alcalina.

As análises das pastas obtidas com teores de alcalinidades e tempos de cozimento diferentes não permitiram tirar conclusões claras sobre precipitação de xilanas na pasta durante o cozimento kraft. Os ensaios de precipitação de xilanas na pasta em experiências modelo com pasta e licor kraft, feitos em condições suaves (80°C e consistência 6%) e baixando o pH do licor negro, permitiram verificar uma precipitação ligeira das xilanas do licor na pasta em simultâneo com a precipitação da lenhina do licor negro. A concorrência das precipitações de xilana e da lenhina é mais acentuada a valores de pH <11,3. Para além da precipitação da xilana na superfície da fibra verificou-se também uma retenção de xilanas no seu interior. Nesta gama de pH existe a contribuição de dois efeitos nos resultados obtidos: o efeito do intumescimento das fibras para valores de pH mais elevados, que resultam em maior difusão e absorção de xilanas e o efeito da precipitação à superfície para valores de pH mais baixos. O abaixamento do pH, na gama de pH estudado (10-13), não será o parâmetro mais importante no processo de deposição das xilanas nas fibras, uma vez que, independentemente do pH final, o grau de precipitação manteve-se aproximadamente constante.

Os ensaios modelos efectuados com fibras da pasta branca e fibras derivadas de algodão (algodão purificado inteiro comercial e Cotton linters) em diferentes condições de pH, tempos de ensaio e com soluções de diferentes concentrações de xilana comercial permitiram a concluir que o enriquecimento das fibras celulósicas com xilana ocorre, não só por mecanismos de precipitação e/ou adsorção na superfície, mas também pelo

mecanismo de difusão para interior da parede de fibra. Neste sentido o pH, a concentração de xilanas na solução e na pasta, assim como o tempo de contacto entre as fibras e a solução, são parâmetros bastante influentes no processo de retenção da xilana nas fibras. Nomeadamente, o aumento da concentração da xilana na solução e o aumento do tempo de contacto resultam em quantidades de xilana nas fibras mais elevadas, como resultados dos mecanismos de adsorção e absorção. O aumento do pH, ao contrário do que se esperava, fez aumentar o grau de retenção nas fibras de celulose devido ao maior intumescimento que o aumento da alcalinidade provoca, e como consequência, à maior facilidade de difusão e absorção das moléculas de xilana no interior das fibras. Nestes ensaios de deposição de xilanas em fibras celulósicas, o teor de xilanas na pasta pode ser então maximizado usando maiores valores de pH, maiores tempos de contacto e maiores concentrações de xilana na solução. No entanto este processo vai depender também da concentração de xilanas pré-existentes nas fibras, uma vez que para menores teores iniciais de xilana nas fibras, menor será o impedimento à adsorção e mais intensa será a difusão para dentro destas. É de salientar que o peso molecular e o grau de substituição da xilana podem também condicionar a migração da xilana. A morfologia e a estrutura das fibras são factores que também influenciam o aumento do teor de xilana. Fibras mais curtas e com extremidades quebradas apresentam teores de xilana depositada superiores, devido à maior superfície de contacto e à maior facilidade de difusão das xilanas para o seu interior. Pelo contrário e provavelmente, a maior cristalinidade influencia negativamente a retenção das xilanas. O processo de migração das xilanas nas fibras é um processo reversível e depende do gradiente de concentrações de xilana existente entre a solução e as fibras, mantendo todas as outras condições constantes (pH, temperatura e tempo). Os resultados obtidos com a xilana comercial da madeira e a xilana precipitada do licor negro apontam para o mesmo comportamento e a mesma aptidão destas em precipitar nas fibras de celulose.

Assim, os estudos de caracterização e comportamento das xilanas durante o cozimento demonstram que as xilanas podem ser potencialmente recuperadas e precipitadas do licor negro com características estruturais não muito alteradas. Estando as glucanas e as xilanas ligadas entre si, a precipitação conjunta destas duas hemiceluloses ganha importância para o aumento de rendimento da pasta kraft.

Este trabalho abre espaço para a optimização do processo kraft por alteração das condições do cozimento na fase residual e o enriquecimento das pastas kraft com as xilanas

que são extraídas para o licor de cozimento. Nomeadamente, por um controlo mais rigoroso do pH final, para que este não atinja valores muito baixos e favoreça a precipitação da lenhina e o desintumescimento das fibras e por uma injeção de licor rico em xilanas no fim do cozimento, de forma a haver um gradiente de concentração de xilanas significativo entre a pasta e o licor para que estas possam difundir-se para o interior das fibras e serem retidas. Uma outra perspectiva a considerar poderá ser o isolamento das xilanas do licor negro, por acidificação e precipitação, e após adequada purificação, proceder à sua deposição sobre as fibras da pasta final. Desta forma, conseguia-se, por um lado, aumentar o rendimento global do processo e, por outro, ajustar e melhorar as propriedades mecânicas da pasta.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Caderno temático - Importância do sector - Economia, CELPA, www.celpa.pt (consulta Janeiro 2007).
2. Boletim estatístico da Indústria papelreira portuguesa de 2006, Edição CELPA, Lisboa, Julho 2007.
3. Direcção Geral dos Recursos Florestais, Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas (2007) Análise da evolução do comércio externo de produtos florestais, Boletim de Informação, Divisão de estudos e Informação, <http://www.afn.min-agricultura.pt/portal/politica-e-planeamento-florestal/resource/ficheiros/infor-florestal/analise-evol-ce.pdf> (Consulta Fevereiro 2007).
4. Caderno temático - A história do papel, CELPA, www.celpa.pt (consulta Janeiro 2007).
5. Folheto informativo - O Eucalipto, CELPA, www.celpa.pt (consulta Janeiro 2007).
6. Caderno temático - A floresta em Portugal continental, CELPA, www.celpa.pt (consulta Janeiro 2007).
7. Pinto, P. C., Evtuguin, D. V., Pascoal Neto, C. (2005) Structure of hardwood glucuronoxylans: modifications and impact on pulp retention during wood kraft pulping. Carbohydrate Polymers 60, 489-497.
8. Evtuguin, D. V., Tomás, J. L., Silva, A. M. S., Neto, C. P. (2003) Characterization of an acetylated heteroxylan from *Eucalyptus globulus* Labill, Carbohydrate Research 338, 597-604.
9. Klock, U., Muñiz, G. I. B., Hernandez, J. A., Andrade, A. S. (2005) Química da madeira – Texto de apoio, Univ. Federal do Paraná – 3ª edição, Curitiba. (<http://www.madeira.ufpr.br/disciplinasklock/quimicadamadeira/quimicadamadeira.pdf>)

10. Chimelo, J. P. (1989) Anatomia da madeira *In*: LEPAGE, Ennio Silva, Manual de preservação de madeiras. 2ª ed., São Paulo: IPT. Vol. 1, pp 41-67.
11. Bamber, R. K. (1985) The wood anatomy of eucalypts and papermaking. *Appita Journal*, 38 (3), 210-216.
12. Fengel, D., Wegener, G. (1983) Structure and Ultrastructure *in*: Wood – Chemistry, Ultrastructure, Reactions, 1st edition, Walter de Gruyter & Co, Berlin, Germany, pp. 6-25.
13. Fujita, M., Harada, H. (1991) Ultrastructure and formation of wood cell wall, *In*: Wood and Cellulosic Chemistry, Hon, D. N.-S., Shiraishi, N., Eds, Marcel Dekker, New York, USA, pp 3-57.
14. Sjöström, E. (1981) The Structure of Wood *In*: Wood Chemistry – Fundamentals and applications, Academic Press, Inc., San Diego, USA, pp 1-20.
15. Sjöström, E., Westermarck, U. (1999) Chemical Composition of Wood and Pulp: Basic Constituents and Their Distribution, *In*: Analytical Methods in Wood Chemistry, Pulping and Papermaking. Sjöström, E., Alén, R., Eds, Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp 1-19.
16. Johnson, K. G., Overend, R. P. (1991) Lignin-carbohydrate complexes from *Populus Deltoides*. I. Purification and Characterization. *Holzforschung*, 45, 469-475.
17. Salmén, L., Olsson, A.-M. (1998) Interaction between hemicelluloses, lignin and cellulose: structure-property relationships. *Journal of Pulp and Paper Science*, 24 (3), 99-103.
18. Gullichsen, J., Fogelholm C.-J. (eds) (1999) Chemical pulping *In*: Papermaking science and technology, Livro 6, Finnish Paper Engineers' Association e TAPPI.
19. Colodette, J. L., Mokfienski, A., Gomide, J. L., Oliveira, R. C. (2004) Relative importance of wood density and carbohydrate content on pulping yield and product quality. International Papermaking & Environmental Conference. Tianjin, P. R. China, May 12-14. Proceedings Book A, pp. 71-80.

20. Pereira, H., Sardinha, R. (1984) Chemical composition of *Eucalyptus globulus* Labill. *Appita Journal*, 37 (8), 661-664.
21. Patt, R., Kordsachia, O., Fehr, J. (2006) European hardwoods versus *Eucalyptus globules* as a raw material for pulping. *Wood Science and Technology*, 40, 39-48.
22. Fengel, D., Wegener, G. (1983) Cellulose in: *Wood – Chemistry, Ultrastructure, Reactions*, 1st edition, Walter de Gruyter & Co, Berlin, Germany, pp. 66-105.
23. Morohoshi, N. (1991) Chemical Characterization of Wood and its Components. In: *Wood and Cellulosic Chemistry*, Hon, D. N.–S., Shiraishi, N., Eds, Marcel Dekker, New York, USA, pp 331-392.
24. Sjöström, E. (1981-B) Wood polysaccharides In: *Wood Chemistry – Fundamentals and applications*, Academic Press, San Diego, USA, pp 49-66.
25. Henriksson, A., Gatenholm, P. (2001) Controlled assembly of glucuronoxylans onto cellulose fibres. *Holzforschung*, 55 (5), 494-502.
26. Atalla, R. H., Hackney, J. M., Uhlin, I., Thompson, N. S. (1993) Hemicelluloses as structure regulators in aggregation of native cellulose. *International Journal Biologica Macromolecules*, 15 (2), 109-112.
27. Atalla, R. H. (1995) Cellulose and the hemicelluloses: patterns for cell wall architecture and the assembly of lignin. *ISWPC - 8th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry*, June 6-9, Helsinki, Finland, Vol. 1, 77-84.
28. Tokoh, C., Takabe, K., Fujita, M., Saiki, H. (1998) Cellulose synthesized by *Acetobacter xylinum* in the presence of acetyl glucomannan. *Cellulose*, 5, 249-261.
29. Whitney S. E. C., Brigham, J. E., Darke, A. H., Reid, J. S. G., Gidley, M. J. (1995) *In vitro* assembly of cellulose/xyloglucan networks: ultrastructural and molecular aspects. *The Plant Journal*, 8 (4), 491-504.

30. Ebringerová, A. (2006) Structural diversity and application potential of hemicelluloses in: *Macromolecular Symposia - Hemicelluloses*, Fischer K., Heinze, T., Eds, Wiley-VCH, Wiesbaden, Germany, vol. 232, 1-12.
31. Fengel, D., Wegener, G. (1983) *Polyoses (Hemicelluloses)* in: *Wood – Chemistry, Ultrastructure, Reactions*, 1st edition, Walter de Gruyter & Co, Berlin, Germany, pp. 106-131.
32. Shimizu, K. (1991) *Chemistry of Hemicelluloses*, In: *Wood and Cellulosic Chemistry*, Hon, D. N.-S., Shiraishi, N., Eds, Marcel Dekker, New York, USA, pp 177-214.
33. Hansson, J.-A., Hartler, N. (1968) Alkaline degradation of xylans from birch and pine. *Svensk Papperstidnig*, 71 (9), 358-365.
34. Jacobs, A., Dahlman, O. (2001) Characterization of the Molar Masses of Hemicelluloses from Wood and Pulps Employing Size Exclusion Chromatography and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Biomacromolecules*, 2, 894-905.
35. Lindberg, B., Rosell, K. -G., Svensson, S. (1973) Positions of the O-acetyl groups in birch xylan. *Svensk Papperstidnig*, 76 (1), 30-32.
36. Shatalov, A., Evtuguin, D. V., Neto, C. P. (1999) (2-O- β -D-Galactopyranosyl-4-O-methyl- β -D-glucurono)-D-xylan from *Eucalyptus globulus* Labill. *Carbohydrate Research*, 320, 93-99.
37. Teleman, A., Tenkanen, M., Jacobs, A., Dahlman, O. (2002) Characterization of O-acetyl-(4-O-methylglucurono)xylan isolated from birch and beech. *Carbohydrate Research*, 337, 373-377.
38. Hamilton, J. K., Thompson, N. S. (1958) A comparison of the carbohydrates of hardwoods and softwoods. *Pulp Paper Magazine Canada*, 59 (10), 233-241.
39. Carvalho, M. G. V. S. (1999) Efeito das variáveis de cozimento nas características químicas de pasta kraft de *Eucalyptus globulus*, Tese de doutoramento, Coimbra.

40. Shimizu, K., Samuelson, O. (1973) Uronic acids in Birch hemicellulose, Svensk Papperstidning, 4, 150-155.
41. Johansson, M., Samuelson, O. (1977) Reducing end groups in birch xylan and their alkaline degradation. Wood Science and Technology, 11, 251-263.
42. Andersson, S. I., Samuelsson, O. (1978) Hypochlorite bleaching of birch xylan. Svensk Papperstidning, 81 (3), 79-84.
43. Gyaw, M. O., Timell, T. E. (1960) Constitution of a glucomannan from the wood of Eastern white pine (*Pinits strobus L.*). Canadian Journal of Chemistry, 38, 1957-1966.
44. Mills, A. R., Timell, T. E. (1963) Constitution of three hemicelluloses from the wood engelmann spruce (*Picea engelmann*). Canadian Journal of Chemistry, 41, 1389-1395.
45. Andersson, S. I., Samuelsson, O., Ishihara, M., Shimizu, K. (1983) Structure of the reducing end-groups in spruce xylan. Carbohydrate Research, 111, 283-288.
46. Mian, A. J., Timell, T. E. (1960) Isolation and properties of a glucomannan from the wood of red maple (*Acer rubrum L.*). Canadian Journal of Chemistry, 38, 1511-1517.
47. Mian, A. J., Timell, T. E. (1960) Studies on Ginkgo Biloba, L 3. Constitution of a glucomannan from the wood. Svensk Papperstidning, 63 (24), 884-888.
48. Willför, S., Sjöholm, R., Laine, C., Roslund, M., Hemming, J., Holmbom, B. (2003) Characterisation of water-soluble galactoglucomannans from Norway spruce wood and thermomechanical pulp. Carbohydrate Polymers, 52, 175-187.
49. Timell, T. E. (1960) Isolation of hardwood glucomannans. Svensk Papperstidning, 63 (15), 472-476.
50. Timell, T. E. (1960) Isolation and properties of a glucomannan from the wood of white birch (*Betula papyrifera Marsh.*). Tappi Journal, 43 (10), 844-848.

51. Timell, T. E. (1967) Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses. *Wood Science and Technology*, 1, 45-70.
52. Ebringerová, A., Kramár, A., Domanský, R. (1972) Glucomannan from wood of hornbeam (*carpinus-betulus L*). *Holzforschung*, 26 (3), 89-92.
53. Saka, S. (1991) Chemical Composition and Distribution, In: *Wood and Cellulosic Chemistry*, Hon, D. N.–S., Shiraishi, N., Eds, Marcel Dekker, New York, USA, pp 59-88.
54. Jacobs, A., Lundqvist, J., Stalbrand, H., Tjerneld, F., Dahlman, O. (2002) Characterization of water-soluble hemicelluloses from spruce and aspen employing SEC/MALDI mass spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 337, 711-717.
55. Tester, R. F., Karkalas, J., Qi, X. (2004) Starch – composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*, 39, 151-165.
56. Jones, J. K. N., Reid, P. E. (1963) Structural studies on the water-soluble arabinogalactans of Mountain and European Larches. *Journal of Polymer Science, Part C*, (2), 63-71.
57. Lynch, R. S., Stilmann, J. E., Timell, T. E. (1968) Studies on Larch arabinogalactan 6. The galactan Framework of Tamarack arabinogalactan. *Svensk Papperstidning*, 71 (24), 890-891.
58. Fu, Y. L., Timell, T. E. (1972) Polysaccharides in compression wood of Tamarack (*Larix-laricina*) 5. Constitution of an acidic arabinogalactan. *Svensk Papperstidning*, 75 (16), 680-682.
59. Adams, G. A. (1964) Water soluble polysaccharides of sugar Maple (*Acer saccharum*). *Svensk Papperstidning*, 67 (3), 82-88.
60. Sakakibara, A. (1991) Chemistry of lignin In: *Wood and Cellulosic Chemistry*, Hon, D. N. –S., Shiraishi, N., Eds, Marcel Dekker, New York, USA, pp 113-175.

61. Fengel, D., Wegener, G. (1983) Lignin in: Wood – Chemistry, Ultrastructure, Reactions, 1st edition, Walter de Gruyter & Co, Berlin, Germany, pp. 132-181.
62. Dence, C. W., Lin, S. Y. (1992) Introduction In: Methods in Lignin Chemistry, Stephen Y. Lin, Carlton W. Dence, Eds, Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp 3-17.
63. Sjöström, E. (1981) Lignin *In*: Wood Chemistry – Fundamentals and applications, Academic Press, San Diego, USA, pp 68-82.
64. Fergus, B. J., Goring, D. A. I. (1970). Distribution of lignin in Birchwood as determined by ultraviolet microscopy. *Holzforschung*, 24 (4), 113-117.
65. Evtuguin, D., Neto, C. P., Silva, A. M. S., Domingues, P. M., Amado, F. M. L., Robert, D., Faix, O. (2001). Comprehensive Study on Chemical Structure of Dioxane Lignin from plantation *Eucalyptus globules* wood. *Journal of Agriculture and food chemistry*, 49, 4252-4261.
66. Evtuguin, D. V., Goodfellow, B. J., Neto, C. P., Terashima, N. (2005) Characterization of lignin-carbohydrate linkages in *Eucalyptus globulus* by 2D/3D NMR spectroscopy using specific carbon-13 carbon labelling techniques. ISWFPC - 13th International Symposium on Wood, Fibre and Pulping Chemistry, May 16-19, Auckland, New Zealand, Vol 2, 439-444.
67. Lai, Y-Z. (1991) Chemical Degradation In: Wood and Cellulosic Chemistry, Hon, D. N. –S., Shiraishi, N., Eds, Marcel Dekker, New York, pp 455-524.
68. Gierer, J. (1980) Chemical aspects of kraft pulping. *Wood Science and Technology*, 14, 241-266.
69. Brunow, G., Lundquist, K., Gellerstedt, G. (1999) Lignin *In*: Analytical Methods in Wood Chemistry, Pulping and Papermaking. Sjöström, E., Alén, R., Eds, Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp 193-226.
70. Gierer, J. (1982) The chemistry of delignification – a general concept. Part 1. *Holzforschung*, 36, 43-51.

71. Gierer, J. (1982) The chemistry of delignification – a general concept. Part 2. *Holzforschung*, 36, 55-64.
72. Gierer, J. (1985) Chemistry of delignification. Part 1: General concept and reactions during pulping. *Wood Science and Technology*, 19, 289-312.
73. Gierer, J., Norén, I. (1981) Contribution to the chemistry of the alkaline wood reduction. *Papier*, 35 (10A), V18-V24.
74. Fengel, D., Wegener, G. (1983) Reactions in Alkaline Medium in: *Wood – Chemistry, Ultrastructure, Reactions*, 1st edition, Walter de Gruyter & Co, Berlin, pp. 296-318.
75. Adler, E. (1977) Lignin chemistry - Past, present and future. *Wood Science and Technology*, 11 (3), 169-218.
76. Fengel, D., Wegener, G. (1983) Pulp Processes in: *Wood – Chemistry, Ultrastructure, Reactions*, 1st edition, Walter de Gruyter & Co, Berlin, pp. 414-481.
77. Irvine, G. M., Clark, N. B., Recupero, C. (1996) Extended Delignification of Mature and Plantation Eucalypt Wood. Part I: The Principles of Extended Delignification, *Appita Journal*, 49 (4), 251-257, 273.
78. Kubes, G. J., Fleming, B. I., MacLeod, J. M., Bolker, H. I., Werthemann, D. P. (1983) Viscosities of unbleached alkaline pulps. II. The G-factor. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 3 (3), 313.
79. Sjöblom, K. (1988) Extended delignification in kraft cooking through improved selectivity. Part 3. The effect of dissolved xylan on pulp yield. *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, 1, 34-37.
80. Sjöström, E. (1981) *Pulping Chemistry In: Wood Chemistry – Fundamentals and applications*, Academic Press, Inc., San Diego, USA, pp 104-144.

81. Carvalho, M. G. V. S. (2003) Módulo: Cozimento, Lavagem e Crivagem – Mod.2 – O processo de cozimento kraft. Mestrado em engenharia dos processos de produção de pasta para papel.
82. Grace, T., Leopold, B., Malcolm, E. (1989) Alkaline Pulping in: Pulp and paper manufacture, 3rd ed., Vol 5, TAPPI/CPPA, Atlanta.
83. Gierer, J., Norén, I. (1962) Über die Reaktionen des Lignins bei der Sulfatkochung. II. Modellversuche zur Spaltung von Aryl-alkylätherbindungen durch Alkali. Acta Chemica Scandinavica, 16 (7), 1713-1729.
84. Vanchinathan, S., Krishnagopalan, G. A. (1995) Kraft delignification kinetics based on liquor analysis. Tappi Journal, 78 (3), 127-132.
85. Chiang, V. L., Funaoka, M. (1990) The dissolution and condensation reactions of guaiacyl and syringyl units in residual lignin during kraft delignification of sweetgum. Holzforschung, 44 (2), 147-155.
86. Kubes, G. J., Fleming, B. I., MacLeod, J. M., Bolker, H. I. (1980) Alkaline pulping with additives. A review. Wood Science and Technology, 14 (3), 207-228.
87. Fleming, B. I., Bolker, H. I., Kubes, G. J., MacLeod, J. M., Werthemann, D. B. (1980) Sulfide as a reducing agent in kraft delignification. Tappi Journal, 63 (11), 73-77.
88. Gellerstedt, G., Lindfors, E.-L. (1984) Structural changes in lignin during kraft pulping. Holzforschung, 38 (3), 151-158.
89. Gellerstedt, G., Gustafsson, K., Northey, R. A. (1988) Structural changes in lignin during kraft cooking – Part 8. Birch lignins. Nordic Pulp Paper Research Journal, 3 (2), 87-94.
90. Kondo, R., Sarkanen, K. V. (1984) Kinetics of Lignin and Hemicellulose dissolution during the initial stage of alkaline pulping. Holzforschung, 38, 31-36.

91. Paavilainen, L. (1989) Effect of sulphate cooking parameters on the papermaking potential of pulp fibres. *Paperi ja Puu*, 71 (4), 356-363.
92. Lindgren, C. T., Lindström, M. E. (1997) Kinetics of bulk and residual delignification in kraft pulping of birch and factors affecting the amount of residual phase lignin. *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, 12 (2), 124-134.
93. Gierer, J., Norén, I., Wännström, S. (1987) Formation of condensation products on treatment of non-phenolic units of β -aryl ether type with alkali. Model studies on a novel mode of alkaline lignin condensation. *Holzforschung*, 41 (2), 79-82.
94. Yang, R., Lai, Y.-Z. (1997) The influence of kraft cooking conditions on the nature of residual lignin. ISWPC - 9th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry, June 9-12, Montréal, Canada, Oral Presentations, 53-1 - 53-4.
95. Yamasaki, T., Hosoya, S., Chen, C.-L., Gratzl, J. S., Chang, H.-m. (1981) Characterization of residual lignin in kraft pulp. "The Ekman-Days 1981" ISWPC - International Symposium on Wood and Pulping Chemistry, June 9-12, Stockholm, Vol. 2, 34-42.
96. Evans R., Newman R.H., Roick U.C., Suckling I.D. and Wallis A.F.A. (1995) Changes in cellulose crystallinity during kraft pulping. Comparison of infrared, X-ray diffraction and solid state NMR results. *Holzforschung*, 49 (6), 498-504.
97. Hult, E.-L., Larsson, P.T., Iversen, T. (2000) A comparative CP/MAS ^{13}C -NMR study of cellulose structure in spruce wood and kraft pulp. *Cellulose*, 7 (1), 35-55.
98. Liitiä, T., Maunu, S. L., Hortling, B., Tamminen, T., Pekkala, O., Varhimo A. (2003) Cellulose crystallinity and ordering of hemicelluloses in pine and birch pulps as revealed by solid-state NMR spectroscopic methods. *Cellulose*, 10 (4), 307– 316.
99. Sjöström, E. (1977) The behavior of wood polysaccharides during alkaline pulping processes. *Tappi Journal*, 60 (9), 151-154.

100. Saarnio, J., Gustafsson, C. (1953) The dissolving and destruction of carbohydrates during the sulfate cook. *Paperi ja Puu*. 33 (3), 65-66, 78.
101. Yllner, S. Enström, B. (1956) Studies of the adsorption of xylan on cellulose fibres during the sulphate cook. Part 1, *Svensk Papperstidning* 59 (20), 229-232.
102. Chiang, V. L., Cho, H. J., Puumala, R. J., Eckert, R. E., Fuller, W. S. (1987) Alkali consumption during kraft pulping of Douglas-fir, western hemlock and red alder. *Tappi Journal*, 70 (2), 101-104.
103. Saucedo, V. M., Josephson, W. E., Krishnagopalan, G. A. (2002) Dynamic modelling of carbohydrates degradation in kraft pulping of hardwood. *Appita Journal*, 55 (5), 398-403.
104. Johansson, M. H., Samuelson, O. (1975) End-wise degradation of hydrocellulose during hot alkali treatment. *Journal of Applied Polymer Science*, 19, 3007-3013.
105. Jiang, Z.-H., Van Lierop, B., Berry, R. (2000). Hexenuronic acid groups in pulping and bleaching chemistry. *Tappi Journal*, 83 (1), 167-175.
106. Matthews, C. (1974) Carbohydrate Losses at High Temperature in Kraft Pulping. *Svensk Papperstidning*, 77 (17), 629-635.
107. Johansson, M., Samuelson, O. (1977) Epimerization and Degradation of 2-O-(4-O-Methyl- β -D-Glucopyranosyluronic acid)-D-Xylitol in Alkaline-medium. *Carbohydrate Research*, 54 (2), 295-299.
108. Chakar, F. S., Allison, L., Ragauskas, A. J., McDonough, T. J. (2000) Influence of Hexenuronic acids on US bleaching operations. *Tappi Journal Peer Reviewed Paper*, November, 1-9.
109. Buchert, J., Teleman, A., Harjunpää, V., Tenkanen, M., Viikari, L., Vuorinen, T. (1995) Effect of cooking and bleaching on the structure of xylan in conventional pine kraft pulp. *Tappi Journal*, 78 (11), 125-130.

110. Buchert, J., Laine, J., Tenkanen, M., Vuorinen, T., Viikari, L. (1997) Characterization of uronic acids during kraft and superbatches pulping. ISWPC - 9th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry, June 9-12, Montréal, Québec, Canada, Oral Presentation, M3-1-M3-3.
111. Gustavsson, C. A-S., Sjöström, K., Al-Dajani, W. W. (1999) The influence of cooking conditions on the bleachability and chemical structure of kraft pulps. *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, 14 (1), 71-81.
112. Teleman, A., Harjunpää, V., Tenkanen, M., Buchert, J., Hausalo, T., Drakenberg, T., Vuorinen, T. (1995). Characterisation of 4-deoxy- β -L-threo-hex-4-enopyranosyluronic acid attached to xylan in pine kraft pulp and pulping liquor by ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 272, 55-71.
113. Tanczos, I., Schwarzing, C., Schmidt, H., Balla, J. (2003) THM-GC/MS analysis of model uronic acids of pectin and hemicelluloses. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 68-69, 151-162.
114. Gustavsson, C. A-S., Al-Dajani, W. W. (2000) The Influence of Cooking Conditions on the Degradation of Hexenuronic Acid, Xylan, Glucomannan and Cellulose During Kraft Pulping of Softwood. *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, 15 (2), 160-167.
115. Danielsson, S., Kisara, K., Lindström, M. E. (2006) Kinetic study of hexenuronic and methylglucuronic acid reactions in pulp and in dissolved xylan during kraft pulping of hardwood. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 45 (7), 2174-2178.
116. Simonson, R. (1963) The hemicellulose in the sulfate pulping process. Part 1 – The isolation of hemicellulose fraction from Pine Sulfate Cooking Liquors. *Svensk Papperstidning*, 66 (20), 839-845.
117. Aurell, R., Hartler, N. (1965) Kraft pulping of pine – Part I. *Svensk Papperstidning*, 68 (3), 59.

118. Aurell, R., Hartler, N. (1965) Kraft pulping of pine – Part II. Svensk Papperstidning, 68 (4), 97.
119. Genco, J. M., Busayasakul, N., Medhora, H. K., Robbins, W. (1990) Hemicellulose retention during kraft pulping. Tappi Journal, April, 223-233.
120. Dillen, S., Noreus, S. (1968) Kraft Pulping with Recirculation of Cooking Liquor Containing Hemicellulose. Svensk Papperstidning, 71 (15), 509.
121. Bikova, T., Klevinska, V., Treimanis, A. (2000) Monitoring of lignin and hemiceluloses in spent cooking liquor during kraft delignification. Holzforschung, 54 (1), 66-70.
122. Simonson, R. (1971) The hemicellulose in the sulfate pulping process. Svensk Papperstidning, 74 (21), 691-700.
123. Dahlman, O. (2003) Effects of hardwood xylan dissolution/sorption on fibre charge and pulp yield. Colóquio Internacional sobre celulose kraft de eucalipto, UFV/Viçosa (MG), pp 59-74.
124. Sjöberg, J. (2003) Characterization of chemical pulp fiber surfaces with an emphasis on the hemicellulose. Ph.D Thesis, Royal Institute of Technology (KTH), Stockholm, Sweden.
125. Sjöberg, J., Potthast, A., Rosenau, T., Kosma, P., Sixta, H. (2005) Cross-sectional analysis of the polysaccharide composition in cellulosic fiber materials by enzymatic peeling/high-performance capillary zone electrophoresis. Biomacromolecules, 6, 3146-3151.
126. Hannuksela, T., Tenkanen, M., Holmbom, B. (2002) Sorption of dissolved galactoglucomannans and galactomannans to bleached kraft pulp. Cellulose, 9(3-4), 251-261.
127. Dahlman, O., Sjöberg, J. (2003) Effects of surface hardwood xylan on the quality of softwood pulps. Nordic Pulp and Paper Research Journal, 18 (3), 310-315.

128. Dahlman, O., Jacobs, A., Sjöberg, J. (1999) Xylan structure and distribution in kraft pulp fibers. ISWPC - 10th International symposium on wood and pulping chemistry, data, Yokohama, Japan, Vol I, 186-189.
129. Hannuksela, T., Fardim, P., Holmbom, B. (2003) Sorption of spruce O-acetylated galactoglucomannans onto different pulp fibres. *Cellulose*, 10, 317-324.
130. Mittika, M., Teeäär, R., Tenkanen, M., Laine, J., Vuorinen, T. (1995) Sorption of Xylans on Cellulose fibers. ISWPC - 8th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry, June 6-9, Helsinki, Finland, 231-236.
131. Hansson, J.-A., Hartler, N. (1969) Sorption of hemicelluloses on cellulose fibers. I. Sorption of xylans. *Svensk Papperstidning*, 72 (17), 521-530.
132. Saake, B., Kruse, Th., Puls, J. (2001) Investigation on molar mass, solubility and enzymatic fragmentation of xylans by multi-detected SEC chromatography. *Bioresource Technology*, 80, 195-204.
133. Marchessault, R. H., Settineri, W., Winter, W. (1967) Crystallization of xylan in the presence of cellulose. *Tappi Journal*, 50 (2), 55-59.
134. Linder, A. P., Bergman, R., Bondin, A., Gatenholm, P. (2003) Mechanism of assembly of xylan onto cellulose surfaces. *Langmuir*, 19, 5072-5077.
135. Westbye, P., Svanberg, C., Gatenholm, P. (2006) The effect of molecular composition of xylan extracted from birch on its assembly onto bleached softwood kraft pulp. *Holzforschung*, 60 (2), 143-148.
136. Mora, F., Ruel, J., Comtat, J., Joseleau, J.-P. (1986) Aspects of native and redeposited xylans at the surface of cellulose microfibrils. *Holzforschung*, 40 (2), 85-91.
137. Sandstrom, P., Lindberg, H., Teder, A. (1985) Development of Modified Kraft Processes with a Mathematical Model for Continuous Digesters. *SCAN-Forsk Rapport*, 441.

138. Clayton, D. W., Stone, J. E. (1963) The redeposition of hemicelluloses during pulping. Part 1: The use of a tritium-labelled xylan. *Pulp and Paper Magazine of Canada*, 64 (11), T459-T468.
139. Imai, T., Yasuda, S., Terashima, N. (1997) Determination of the distribution and reaction of polysaccharides in wood cell walls by the isotope tracer technique V. Behavior of xylan during kraft pulping studies by the radiotracer technique. *Journal of Japan Wood Research Society*, 43, 241-246.
140. Neto, C. P., Belino, E., Evtuguin, D., Silvestre, A. J. D. (1999). Total fractionation and analysis of organic components of industrial *Eucalyptus globulus* kraft black liquor. *Appita Journal*, 52 (3), 213-217, 225.
141. Gonçalves, C. R. S., Pereira, S. M., Lanna, I. B., Cardoso, M., Mendes, M. L. D., Edmunds, R. L. (2002) Caracterização química do licor negro de Eucalipto e sua influência na geração de vapor em caldeiras de recuperação, 35º Congresso e Exposição Anual de Celulose e Papel, ABTCP, 14-17 de Outubro, 2002, São Paulo, Brasil.
142. Grace, T. M., Sachs, D. G., Grady, H. J. (1977) Determination of the inorganic composition of alkaline black liquors. *Tappi Journal*, 60 (4), 122-1255.
143. Alén, R., Rytönen, S., McKeough, P. (1995) Thermogravimetric behavior of black liquors and their organic constituents. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 31, 1-13.
144. Niemelä, K., Alén, R., Sjöström, E. (1985) The formation of Carboxylic acids during kraft and kraft-anthraquinone pulping of birch wood. *Holzforschung*, 39 (3), 167-172.
145. Alén, R., Vikkula, A. (1989) Formation of lignin monomers during kraft pulping of birch wood. *Cellulose Chemistry and Technology*, 23 (5), 579-58.
146. Söderhjelm, L., Hausalo, T. (1996) Extensive Analysis of Strong Black Liquor. *Appita Journal*, 49 (4), 263-268.

147. Niemelä, K. (1989) Carboxylic acids in Eucalypt kraft black liquor. ISWPC - 6th International Symposium on Wood and Pulp Chemistry, Melbourne, Australia, Vol II, 453-457.
148. Engström, N., Vikkula, A., Teleman, A., Vuorinen, T. (1995) Structure of hemicellulose in pine kraft cooking liquors. ISWPC - 8th International Symposium on Wood and Pulp Chemistry, June 6-9, Helsinki, Finland, Vol III, 195-200
149. Barata P. A., (2003) Módulo: Tecnologias de cozimento. Mestrado em engenharia dos processos de produção de pasta para papel.
150. Carvalho, M. G., Figueiredo, M. M. (2000) Influência das condições de cozimento nas características de pasta kraft cruas de *E. globulus* português. CIADICYP - Congresso iberoamericano de investigación en celulosa y papel, 18-20 de Outubro Iguazú, Argentina (comunicação oral).
151. Santiago, A. S., Pascoal Neto, C. (2007) Review: Assessment of potential approaches to improve *Eucalyptus globulus* kraft pulping yield. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 82, 424-430.
152. Fardim, P., Durán, N. (2004) Retention of cellulose, xylan and lignin in kraft pulping of *Eucalyptus* studies by multivariate data analysis: Influences on physicochemical and mechanical properties of pulp. Journal of Brazilian Chemistry Society, 15 (0), 1-9.
153. Dong, D., Fricke, A. L. (1996) Investigation of pulping effects on pulp yield and the lignin content of black liquor with a central composite kraft pulping design. *Holzforschung*, 50 (1), 75-84.
154. Grace, T. M., Leopold, B., Malcolm, E. W., Kocurek, M. J. (eds) (1989) Alkaline Pulping, *In*: Pulp and paper manufacture, 3rd ed., Vol 5, TAPPI/CPPA, Atlanta.
155. Viqueira, J. A. S. (1984) Influencia de la sulfidez en los resultados de la coccion de *E. globulus*. *Investigación y técnica del papel*, 81, 529-537.

156. Chistiansen, C. B., Hart, J. S., Ross, J. H. (1957) Sulphidity as a variable in the pulping of western red cedar: the effect of the Na₂S/wood ratio on the pulp properties. *Tappi Journal*, 40 (5), 355-361.
157. Anjos, O., Santos, A., Simões, R. (2004) Influence of the hemicelluloses content on the paper quality produced with *Eucalyptus globulus* fibres. *Proceedings of progress in paper physics seminar, Norway, Trondheim, 21-24 de Junho*, pp 50-52.
158. Anjos O., Santos A., Simões R. (2005). Efeito do teor de hemiceluloses na qualidade do papel produzido com fibra de Eucalipto *In: Actas das comunicações, 5º Congresso Florestal Nacional, Rui Silva e Fernando Páscoa Editores.*
159. Molin, U., Teder, A. (2002) Importance of cellulose/hemicellulose ratio for pulp strength. *Nordic Pulp & Paper Research Journal*, 17, 1-14.
160. Schönberg, C., Oksanen, T., Suurnäkki, A., Kettunen, H., Buchert, J. (2001) The importance of xylan for the strength properties of spruce kraft pulp fibres. *Holzforschung*, 55 (6), 639-644.
161. Meller, A. (1965) The retake of xylan during alkaline pulping. A critical appraisal of the litterature. *Holzforschung*, 19 (4), 118-124.
162. Saake, B., Busse, T., Puls, J. (2005) The effect of xylan adsorption on the properties of sulfite and kraft pulps. *ISWFPC - 13th International Symposium on Wood, Fibre and Pulping Chemistry, May 16-19, Auckland, New Zealand, Vol 2*, 141-146.
163. Buchert, J., Tenkanen, M., Teleman, A., Viikari, L., Vuorinen, T. (1996) Effects of pulping and bleaching on pulp carbohydrates and technical properties. *International Pulp Bleaching Conference, Washington DC, USA, Book 1*, pp 39-42.
164. Pazur, J. H. (1994). *Neutral polysaccharides in: Carbohydrate Analysis: A practical Approach*, Chaplin, M. F., Kennedy, J. F., Eds, 2nd ed., IRL Press at Oxford University Press: New York, pp. 73-102.

165. Vuorinen, T., Alén, R. (1999) Carbohydrates *In: Analytical Methods in Wood Chemistry, Pulp and Papermaking*. Sjöström, E., Alén, R., Eds, Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp 37-71.
166. Saeman, J. F., Moore, W. E., Mitchell, R. L., Millet, M. A. (1954) Techniques for the Determination of Pulp Constituents by Quantitative Paper Chromatography. *Tappi Journal*, 37 (8), 336-343.
167. Selvedran, R. R., March, J. F., Ring, S. G., (1979). Determination of aldoses and uronic acids content of vegetable fiber. *Analytical. Biochemistry*, 96, 282-292.
168. Blumenkrantz, N., Asboe-Hansen, G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acid. *Analytical. Biochemistry*, 54(2), 484-489.
169. Lindberg, B. (1978) Methylation analysis of polysaccharides. *Methods in Enzymology*, 50, 178-195.
170. Lindberg, B., Rosell, K. -G., Svensson, S. (1973) Positions of the O-acetyl groups in birch xylan. *Svensk Papperstidning*, 76 (1), 30-32.
171. Lindberg, B., Lönngrén, J. (1978). Methylation analysis of complex carbohydrates: general procedure and application for sequence analysis. *Methods in Enzymology*, 50, 3-33.
172. Ring, S. G., Selvedran, R. R. (1978). Purification and methylation analysis of cell-wall materials from *Solanum-tuberosum*. *Phytochemistry.*, 17 (4), 745-752.
173. Gonçalves, M. L. S. S. (1996) Espectrofotometria do visível e ultravioleta em: *Métodos instrumentais para análise de soluções – Análise quantitativa*, 3ª edição, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, pp 13-82.
174. McGrance, S. J., Cornell, H. J., Rix, C. J. (1998) A simple and rapid colorimetric method for the determination of amylose in starch products, *Starch/Stärke*, 4, 158-163.

175. Ajithkumar, A., Andersson, R., Christerson, T., Aman, P. (2005) Amylose and β -glucan content of new waxy barleys. *Starch/Stärke*, 57, 235-239.
176. Evtuguin, D. V., Daniel, A. I. D., Neto, C. P. (2002). Determination of Hexenuronic Acid and Residual Lignin in Pulps by UV Spectroscopy in Cadoxen Solutions. *Journal of Pulp Paper Science*, 28 (6), 189-192.
177. Obolenskaja, A. V., Elnitskaja, Z. P., Leonovich, A. A. (1991). *Laboratory Practical Works on Chemistry of Wood and Cellulose*, Ecology, Moskow.
178. Rebuzzi, F., Evtuguin, D. V. (2006) Effect of glucuronoxylan on the hornification of Eucalyptus globulus bleached pulps, *Macromolecules Symposium*, 232, 121-128.
179. Sun, R. C., Fang, J. M., Tomkinson, J., Geng, Z. C., Liu, J. C. (2001) Fractional isolation, physico-chemical characterization and homogeneous esterification of hemicelluloses from fast-growing poplar wood. *Carbohydrate Polymers*, 44, 29-39.
180. Fengel, D., Wegener, G. (1983) *Chemical Composition and Analysis of Wood in: Wood – Chemistry, Ultrastructure, Reactions*, 1st edition, Walter de Gruyter & Co, Berlin, pp. 26-65.
181. Simonson, R. (1965) The hemicellulose in the sulfate pulping process. Part 3 – The isolation of hemicellulose fraction from birch sulfate cooking liquors. *Svensk Papperstidning*, 68 (8), 275-280.
182. Teleman, A., Lundqvist, J., Tjerneld, F., Stalbrand, H. (2000) Characterization of acetylated 4-O-methylglucuronoxylan isolated from aspen employing ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 329, 807-815.
183. Rydlund, A., Dahlman, O. (1997) Oligosaccharides obtained by enzymatic hydrolysis of birch kraft pulp xylan: Analysis by capillary zone electrophoresis and mass spectrometry. *Carbohydrate Research*, 300, 95-102.
184. Nilsson, G. S., Bergquist, K. E., Nilsson, U., Gorton, L. (1996). Determination of the degree of branching in normal and amylopectin type potato starch with ^1H

- NMR spectroscopy – Improved resolution and two-dimensional spectroscopy. *Starch/Stärke*, 48, 352-357.
185. Teleman, A., Kruus, K., Ämmälähti, E., Buchert, J. & Nurmi, K. (1999). Structure of dicarboxyl malto-oligomers isolated from hypochlorite-oxidised potato starch studied by ¹H and ¹³C NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 315, 286-292.
 186. Teleman, A., Hausalo, T., Tenkanen, M., Vuorinen, T. (1996) Identification of the acidic degradation products of hexenuronic acid and characterisation of hexenuronic acid substituted Xilo-oligosaccharides by NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 280, 197-208.
 187. Stenius, P., Vuorinen, T. (1999) Direct Characterization of chemical properties of fibres *In: Analytical Methods in Wood Chemistry, Pulping and Papermaking*. Sjöström, E., Alén, R. (Eds), Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp 37-71.
 188. Tenkanen, M., Hausalo, T., Siikaaho, M., Buchert, J., Viikari, L. (1995) Use of Enzymes in combination with anion exchange chromatography in analysis of carbohydrate composition of kraft pulps. ISWPC - 8th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry, June 6-9, Helsinki, Finland, Vol 3, 189-194.
 189. Dahlman, O., Rydlund, A., Lindquist, A. (1997) Characterization of carbohydrates from chemical pulps using capillary electrophoresis and MALDI-TOF-MS. ISWPC - 9th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry, June 9-12, Montréal, Canada, L5- 1-4.
 190. Dahlman, O., Jacobs, A., Liljenberg, A., Olsson, A. I. (2000) Analysis of carbohydrates in wood and pulps employing enzymatic hydrolysis and subsequent capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 891, 157-174.
 191. Rättö, M., Siika-aho, M., Buchert, J., Valkeajärvi, A., Viikari, L. (1993) Enzymatic hydrolysis of isolated and fibre-bound galactoglucomannans from pine-wood and pine kraft pulp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 40, 449-454.

192. Pasanen, S., Jänis, J., Vainiotalo, P. (2007) Cello-, malto- and xylooligosaccharide fragmentation by collision-induced dissociation using QIT and FT-ICR mass spectrometry: a systematic study. *International Journal of Mass Spectrometry*. 263, 22-29.
193. Reis, A., Coimbra, M.A., Domingues, P., Ferrer-Correia, A.J., Domingues, M.R.M. (2002) Structural characterisation of underivatised olive pulp xylo-oligosaccharides by mass spectrometry using matrix-assisted laser desorption/ionisation and electrospray ionisation. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 16, 2124-2132.
194. Reis, A., Domingues, M.R.M., Domingues, P., Ferrer-Correia, A. J., Coimbra, M. A. (2003) Positive and negative electrospray ionisation tandem mass spectrometry as a tool for structural characterisation of acid released oligosaccharides from olive pulp glucurunoxyllans. *Carbohydrate Research*, 338, 1497-1505.
195. Reis, A., Pinto, P., Evtuguin, D.V., Neto, C.P., Domingues, P., Ferrer-Correia, A. J., Domingues, M. R. M. (2005) Electrospray tandem mass spectrometry of underivatised acetylated xylo-oligosaccharides. *Rapid communications in mass Spectrometry*, 19, 3589-3599.
196. Reis, A., Pinto, P., Coimbra, M.A., Evtuguin, D.V., Neto, C.P., Ferrer-Correia, A. J., Domingues, M. R. M. (2004) Structural differential of uronosyl substitution patterns in acidic heteroxyllans by electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of American Society for Mass Spectrometry*, 15, 43-47.
197. Hofmeister, G. E., Zhou, Zh., Leary, J. A. (1991) Linkage position determination in lithium-cationized disaccharides: Tandem mass spectrometry and semiempirical calculations. *Journal of American Chemical Society*, 113 (16), 5964-5970.
198. Simões, J., Domingues, P., Reis, A., Nunes, F. M., Coimbra, M. A., Domingues, M. R. M. (2007) Identification of Anomeric Configuration of Underivatized Reducing lucopyranosyl-glucose Disaccharides by Tandem Mass Spectrometry and Multivariate Analysis. *Analytical Chemistry*, 79 (15), 5896-5905.

199. Fardim, P., Durán, N. (2003) Modification of fibre surface during pulping and refining as analysed by SEM, XPS and ToF-SIMS. *Colloids and surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 223, 263-276.
200. Briggs, D. (1990). Surface analysis *in*: *Polymers: Polymer characterization and analysis*. Kroschwitz, J. I. Eds., John Wiley & Sons, Inc., USA, pp 793-836.
201. Wedler, G. (2001) Termodinâmica química: Equilíbrio em interfaces *in*: *Manual de química física*, Eds Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, Portugal, pp 411-446.
202. Pinto, P. C., Evtuguin, D. V., Neto, C. P. (2005) Effect of structural features of wood biopolymers on hardwood pulping and bleaching performance. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 44 (26), 9777-9784.